



Universidade Nova de Lisboa

Transglutaminases de *Anopheles gambiae*:
caracterização molecular, bioquímica e histológica.

Isa Raquel Paiva Pires

**DISSERTAÇÃO PARA A OBTENÇÃO DO GRAU DE MESTRE EM
PARASITOLOGIA MÉDICA**

OUTUBRO, 2012



Universidade Nova de Lisboa

Transglutaminases de *Anopheles gambiae*: caracterização molecular, bioquímica e histológica.

Isa Raquel Paiva Pires

Licenciada em Biologia, ramo Biologia Molecular e Genética pela Faculdade de
Ciências da Universidade de Lisboa

Dissertação apresentada para cumprimento dos requisitos necessários à obtenção do
grau de Mestre em Parasitologia Médica.

Orientador: Investigadora Dr^a Ana Custódio
Unidade de Parasitologia Médica
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

Co-orientador: Professor Dr Henrique Silveira
Unidade de Parasitologia Médica
Instituto de Higiene e Medicina Tropical

OUTUBRO, 2012

Agradecimentos

A presente tese de mestrado foi realizada no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT), em Lisboa, e no Centro de Ciências do Mar (CCMAR) da Universidade do Algarve, em Faro.

Quero agradecer primeiramente à Investigadora Doutora Ana Custódio, minha orientadora, e ao Professor Doutor Henrique Silveira, meu co-orientador, pela vossa supervisão, excelente orientação e pela possibilidade de crescimento pessoal e profissional que me proporcionaram durante este trabalho. Foi com a vossa ajuda que aprendi muito mais do que imaginei e me tornei ainda mais motivada para continuar a aprender e a trabalhar na área de investigação científica. Um agradecimento especial à Investigadora Doutora Ana Custódio pela sua paciência infindável e compreensão.

À Professora Doutora Deborah Power pela orientação na minha curta, mas bem sucedida estadia na Universidade do Algarve. Muito obrigada por me incentivar na discussão e pela oportunidade de realizar um trabalho diferente e muito gratificante.

À Catarina Alves pela sua amizade e por manter e cuidar dos mosquitos e larvas do insectário de *Anopheles gambiae*, permitindo que eu fizesse as minhas experiências.

Às minhas colegas de equipa Joana Gomes, Luísa Simões e Lara Borges pelo companheirismo, ajuda e amizade com que me presentearam no dia-a-dia do laboratório, permitindo uma integração fácil e proveitosa. Um agradecimento especial à Joana por toda a ajuda nas dissecações e alimentações.

À minha amiga Lis Lobo pelo apoio incondicional, partilha de horas extra no laboratório e não só, sem ti tudo teria sido mais difícil.

Aos meus colegas de mestrado e de gabinete por me permitirem descontrair e rir em várias alturas do dia. Pela ajuda e discussão de soluções para que o trabalho fluísse.

Ao Pedro Palma e Patrícia Mateus, da Universidade do Algarve, por me terem acolhido de forma tão simpática, por me terem ensinado os “cantos à casa” e acima de tudo pela ajuda na resolução de problemas, pelas dicas e paciência.

À minha prima Joana Sousa por me distrair nas alturas certas e por me apoiar

sem restrições. Ao César Delgado por nunca me deixar desmotivar e por me mostrar tudo o que eu não via ou não queria ver.

À Rosa Maria Souza e Ricardo Souza por toda a ajuda e por todo o apoio convencional e não convencional dado. Sem vocês nunca teria chegado ao fim do caminho. Muito obrigada por tudo!

Por fim aos melhores pais do mundo, os meus pais, e à minha irmã, pois sem vocês eu não teria feito o mestrado. Muito obrigado pela vossa fé em mim, pelo vosso amor, carinho e apoio. Espero deixá-los muito orgulhosos do trabalho que fiz.

Resumo

Transglutaminases de *Anopheles gambiae*: caracterização molecular, bioquímica e histológica.

Isa Raquel Paiva Pires

Palavras-chave: Transglutaminase, *Anopheles gambiae*, *Plasmodium*, coagulação, imunidade.

A malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*, a sua transmissão aos humanos deve-se à picada infecciosa de mosquitos fêmea do género *Anopheles*, sendo *Anopheles gambiae* o vector mais eficiente de malária em todo o mundo. O intestino médio do mosquito representa um dos ambientes mais desafiantes à sobrevivência e desenvolvimento do parasita, e é, portanto, também um dos locais mais atraentes para novas estratégias de controlo da malária, pois é onde se observa uma diminuição acentuada na população de parasitas invasores. A transglutaminase (TGM) desempenha um papel importante e diversificado em mamíferos, tais como a coagulação e a formação da barreira epitelial, catalisando o “crosslinking” entre proteínas. Em invertebrados, como *Drosophila* sp, a proteína TGM mostrou estar envolvida na defesa imunitária. O mosquito *A. gambiae* tem codificado no seu genoma três TGMs, o gene AGAP009099, já caracterizado, é expresso exclusivamente nas MAGs (glândulas auxiliares masculinas). Os genes AGAP009098 e AGAP009100, cujas funções não foram ainda clarificadas, são expressos ubiquamente e em baixos níveis. No presente trabalho, propõe-se a caracterização das duas proteínas codificadas por estes genes, de forma a identificar o modo como estas proteínas interagem dentro do mosquito, a esclarecer o seu papel na invasão do intestino médio de *A. gambiae* por *Plasmodium* spp., o que permitirá averiguar o seu envolvimento ao nível da imunidade inata do mosquito. Foi produzida e purificada a proteína recombinante AgTGM98-1, que se utilizou para a produção de um anticorpo anti-AgTGM98. A atividade de TGM no mosquito não se mostrou estatisticamente significativa entre os estadios larvares, pupas e adultos. A caracterização bioquímica de AgTGM98 e AgTGM100 revelou a possível existência de proteínas do tipo TGM. Através de western blotting, verificou-se uma diminuição de AgTGM98, comparando mosquitos não infetados com infetados por *P. berghei*, o que sugere alterações na expressão desta proteína face à invasão pelo parasita, o que pode significar o seu envolvimento direto na infeção. Caracterizou-se, por imunohistoquímica (IHC) a localização de AgTGM98 e AgTGM100 em intestinos médios de mosquitos. A proteína AgTGM98 apresentou uma localização membranar, na parte basal do intestino médio e com distribuição ao longo deste. Contrariamente, a AgTGM100 tem uma localização intracelular e uma distribuição presente apenas no proventrículo e zona mais apical do intestino médio durante uma fase da sua existência, sendo com o passar do tempo detectada em todo o intestino médio.

Abstract

Anopheles gambiae transglutaminases: molecular, biochemical and histological characterization.

Isa Raquel Paiva Pires

Keywords: Transglutaminase, *Anopheles gambiae*, *Plasmodium*, coagulation, immunity.

Malaria is caused by protozoan parasites of the genus *Plasmodium*, its transmission to humans. Malaria is due the bite of infected female mosquitoes of the genus *Anopheles*, being *Anopheles gambiae* the most efficient vector of malaria worldwide. The mosquito midgut is one of the most challenging environments for the survival and development of the parasite, representing a bottleneck in the parasite development, which makes it one of the most attractive sites for designing new strategies for malaria control. Transglutaminase (TGM) plays an important and diversified role in mammals such as coagulation and formation of the epithelial barrier, catalyzing protein crosslinking. In invertebrates, such as *Drosophila* sp, TGM protein was shown to be involved on immune defense. The mosquito *A. gambiae* has encoded on his genome three TGMs, the gene AGAP009099, already characterized, is expressed exclusively in MAG (male auxiliary glands). The genes AGAP009098 and AGAP009100, although still unclear their functions are ubiquitously expressed at low levels. In this work, we propose the characterization of the two proteins coded by these genes, in order to identify how these proteins interact within the mosquito, to help clarifying the invasion of the midgut of *A. gambiae* by *Plasmodium* spp., and clarify their role in innate immunity. We had been able to produce and purify a recombinant protein AgTGM98-1, which was used for the production of an anti-AgTGM98 antibody. The activity of mosquito TGMs was not statistically significant between the larval stages, pupae and adults. Biochemical characterization of AgTGM98 and AgTGM100 revealed the possible existence of TGMs-like proteins. By western blotting, it was observed a decrease in the amount of AgTGM98, when comparing non-infected mosquitoes with *P. berghei* infected mosquitoes, which suggest changes in the expression of this protein, related to parasite invasion, which may indicate its direct involvement in infection. We had also characterized, by immunohistochemistry (IHC) the location of AgTGM98 and AgTGM100 in midguts of mosquitoes. The protein AgTGM98 localizes on the midgut basal membrane with a distribution along this organ. By opposition to AgTGM100, which has an intracellular localization in the proventriculus and apical region, becoming evenly distributed all over the midgut over time.

Índice

Agradecimentos	I
Resumo	III
Abstract	IV
Índice	V
Lista de abreviaturas	VIII
I - Introdução	1
I.1 - Malária	2
I.2 - <i>Plasmodium</i> spp	3
I.2.1 - Ciclo de vida	3
I.3 - <i>Anopheles gambiae</i> Giles, 1902	5
I.3.1 - Distribuição geográfica.....	6
I.3.2 - Ciclo de Vida	6
I.3.3 - Imunidade no mosquito	9
I.3.3.1 - Receptores de reconhecimento padrões (PRRs).....	10
I.3.4 - Coagulação	13
I.4 - Transglutaminase	16
I.4.1 - Estrutura e propriedades catalíticas	18
I.4.2 - Distribuição de TGM nos seres vivos.....	19
II - Materiais e Métodos	27
II.1 - Materiais	28
II.1.1 - Material biológico	28
II.1.2 - Bactérias <i>Escherichia coli</i> BL21(DE3) PlysS.....	28
II.1.3 - Reagentes.....	29

II.1.4 - Equipamentos	29
II.2 - Métodos	29
II.2.1 - Transformação de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) PlysS por choque térmico	29
II.2.2 - Selecção de clones bacterianos recombinantes	30
II.2.3 - Extração de DNA plasmídico.....	30
II.2.4 - Amplificação por PCR do DNA plasmídico	30
II.2.5 - Análise dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose..	31
II.2.6 - Indução da expressão de células de <i>E. coli</i> BL21 (DE3) PlysS	31
II.2.7 - Purificação da proteína AgTGM98_1 em condições nativas.....	33
II.2.8 - Produção de anticorpos policlonais	33
II.2.9 - ELISA.....	34
II.2.10 - Extração de proteínas	35
II.2.11 - Preparação das extracções proteicas para eletroforese.....	35
II.2.12 - Quantificação proteica.....	36
II.2.13 - Ensaio de atividade da TGM	37
II.2.14 - Análise de proteínas por SDS-PAGE.....	36
II.2.15 - Western blotting	37
II.2.16 - Fixação de material biológico	38
II.2.17 - Hidratação do material biológico “whole mount” e de corte histológico	38
II.2.18 - Bloqueio do material biológico “whole mount” e em corte histológico .	39
II.2.19 - Detecção por imunohistoquímica “whole mount”	39
II.2.20 - Cortes histológicos de material biológico	40
II.2.21 - Detecção por imunohistoquímica de cortes histológicos	40
II.2.22 - Montagem definitivas do material biológico em “whole mount” e em corte histológico.....	41

II.2.23 – Análise estatística	41
III - Resultados	42
III.1 - Transformação das células BL21(DE3) pLys S com plasmídeo pET-28.....	43
III.2 - Produção da proteína recombinante AgTGM98-1 em larga escala.....	44
III.3 - Purificação da proteína recombinante AgTGM98-1	46
III.4 - Produção de soro policlonal contra proteína recombinante AgTGM98-1	46
III.5 - Determinação da atividade enzimática da AgTGM	47
III.6 - Caracterização da AgTGM98.....	47
III.7 - Caracterização da AgTGM100.....	52
III.8 - Localização da β -actina (controlo)	53
III.9 - Localização da AgTGM98	54
III.10 - Localização da AgTGM100	58
IV - Discussão e conclusões	62
V - Referências Bibliográficas	71
Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações	77
Anexos	83
Anexo 1 - Reagentes e equipamentos	83
Anexo 2 - vector pET-28a(+).	86
Anexo 3 - Cálculo da mobilidade electroforética	87
Anexo 4 - Cálculos do ensaio enzimático.....	87

Lista de abreviaturas

A - adenina

AMP - péptidos antimicrobianos (“antimicrobial peptide”)

APL1C - Gene C da família proteínas com repetições ricas em leucinas APL1

APS - persulfato de amónia (“ammonium persulfate”)

Arg - arginina

Asn - asparagina

Asp – aspartato

ATPase - família de enzimas que catalisam a hidrólise de ATP (adenosina trifosfato)

BCIP-5 - bromo-4-cloro-3-indolilfosfato (“5-bromo-4-cloro-3-indolylphosphate”)

BSA – albumina de soro bovina (“Bovine Serum Albumin”)

C - citosina

CDC – “Center for disease control”

CEC – cecropina

CTL - Lectinas do tipo C (“C-type lectine”)

CTLMA - Lectinas do tipo C de ligação a manose (“C-type lectine mannose binding”)

Cys – cisteína

DAB - 3,3'-diaminobenzidina

DEF – defensina

DNA - ácido desoxirribonucleico (“deoxyribonucleic acid”)

dNTP - desoxirribonucleótidos trifosfato (“deoxyribonucleotide triphosphate”)

dp – desvio padrão

DPX - 1,3-dietil-8-fenilxantina (“1,3-diethyl-8-phenylxanthine”)

ECL - quimioluminescência aumentada (“enhanced chemiluminescence”)

EDTA - ácido etileno diamino tetra acético (“ethylenediamine tetraacetic acid”)

ELISA – “Enzyme-Linked Immunosorbent Assay”

G -guanina

GAM - gambicina

GFP – “green fluorescent protein”

Gli - Glicina

Gln- glutamina

Glu - glutamato

GTP – guanosina-5'-trifosfato (“guanosine-5'-triphosphate”)

h – horas

HDL - lipoproteína de alta densidade (“high-density lipoprotein”)

His - histidina

HRP - conjugado peroxidase de rábano (“horseradish peroxidase”)

IHMT – Instituto de higiene e medicina tropical

IMAC – “Immobilized metal ion affinity chromatography”

IMD – imunodeficiência (“immunodeficiency”)

IPTG - isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo

LDL - lipoproteína de baixa densidade (“low-density lipoprotein”)

LRIM1 - Molécula 1 rica em leucina (“leucine-rich repeat immune protein 1”)

LRR - proteínas com repetições ricas em leucinas (“leucine rich repeats”)

MAG - Glândulas auxiliares masculinas (“male auxiliary glands”)

min- minutos

NCBI – “National center for biotechnology information”

NF-kB - Nuclear Factor kB.

Ni-NTA – níquel - ácido nitrilo triacético (“nickel-nitriltriacetic acid”)

nm - nanometros

NO - óxido nítrico (“nitric oxide”)

°C - Graus Celsius

ON - durante a noite (cerca de 16 a 18h) (“over night”)

p/v – peso / volume

PAMP - Reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (“pathogen-associated molecular patterns”)

pb - pares de bases

PBS – “phosphate-buffered saline”

PCR - reacção de polimerização em cadeia (“polymerase chain reaction”)

PO – fenoloxidase (“phenoloxidase”)

PPO - Pro-fenoloxidase (“prophenoloxidase”)

PRR - Receptores de reconhecimento padrões (“pattern recognition receptors”)

PVDF - difluoreto de polivinilideno (“polyvinylidene difluoride”)

SDS-PAGE - dodecil sulfato de sódio – electrophoresis em gel de poliacrilamida (“sodium dodecyl sulfate – polyacrylamide gel electrophoresis”)

seg - segundos

Ser - serina

SRPN - Serpina

STAT - transdutor de sinal e activador da transcrição (“signal transducers and activators of transcription.”)

T - timina

TBE - tampão constituído por tris

TEMED - N,N,N',N'- Tetrametiletenodiamina

TEP - proteínas contendo tioéster (“thioester-containing proteins”)

TGM - transglutaminase

Tris – tri-(hidroximetil)-aminometano

Trp - triptofano

v/v – volume / volume

WHO – organização mundial de saúde (“World Health Organization”)

μl – microlitro

I - Introdução

I.1 - Malária

A malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*, a sua transmissão aos humanos deve-se à picada infecciosa de mosquitos fêmea do género *Anopheles* spp, sendo conhecidas cerca de 30 espécies capazes de transmitir esta doença (WHO, 2011). Estima-se que tenham existido cerca de 216 milhões de casos de malária em termos globais, no ano de 2010, sendo 91% causadas pelo parasita *Plasmodium falciparum*. A grande maioria dos casos (81%) provêm de África. A mortalidade, em termos globais, para o ano de 2010, foi de cerca de 665 000 mortes, destas 86% foram crianças com idade inferior a 5 anos. O continente africano representa 91% das mortes. Foi ainda estimado que em 2010 estiveram em risco cerca de 3,3 mil milhões de pessoas, estando a sua maioria situada a sul do Sahara (WHO, 2011).

Existem 106 países com malária endémica que são acompanhados por programas de controlo e eliminação de malária (Figura I.1). A estimativa de incidência de malária reduziu cerca de 17% desde o ano 2000 e a incidência de mortalidade foi reduzida em 26%. Apesar de todos os esforços de controlo através de controlo de vector e quimioterapia, a taxa de redução que se pretendia para a década 2000-2010 era de 50%, tendo ficado aquém do esperado (WHO, 2012).

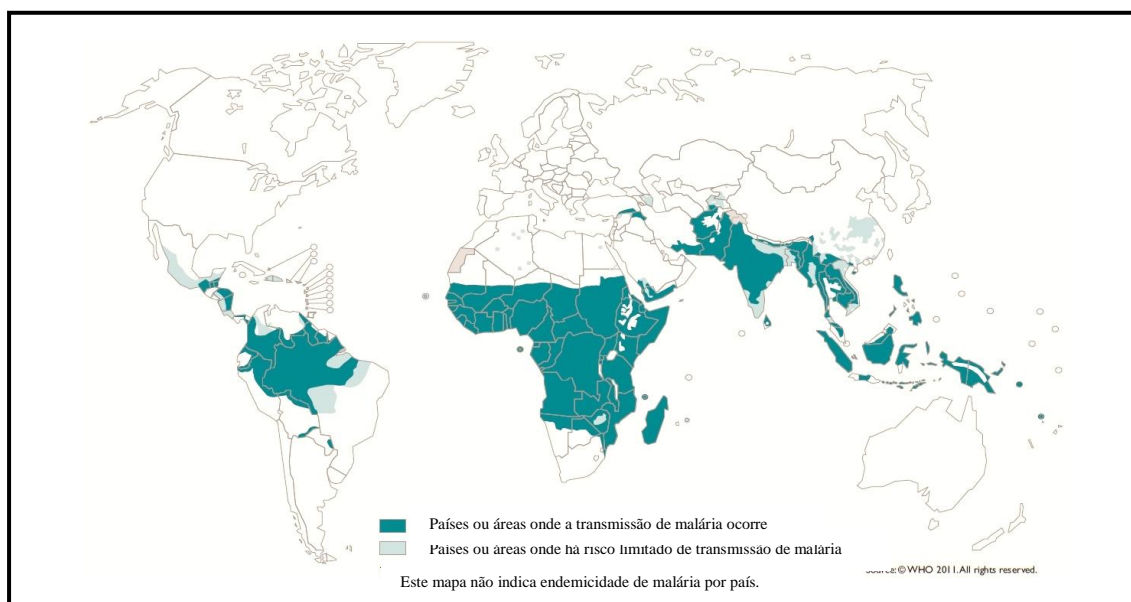


Figura I.1 Mapa com a distribuição de malária no mundo e áreas em risco de transmissão. Adaptado de International Travel and Health book, WHO, 2012.

I.2 - *Plasmodium* spp

A malária é causada por parasitas protozoários do género *Plasmodium*, que taxonomicamente está organizado da seguinte forma: Super-reino Eukaryota, filo Apicomplexa, classe Aconoidasida, ordem Haemosporida, género *Plasmodium* (NCBI Taxonomy Browser, 2012). Dentro do género existem cinco espécies responsáveis pela doença no Homem, *P. falciparum*, *Plasmodium vivax*, *Plasmodium ovale*, *Plasmodium malariae* e *Plasmodium knowlesi*. A malária causada por *P. falciparum* é a mais mortal e é predominante em África, no entanto, *P. vivax* é o que se encontra mais espalhado pelo mundo, sendo as restantes três espécies encontradas com menos frequência (WHO, 2012).

I.2.1 - Ciclo de vida

O ciclo de vida de *Plasmodium* spp desenvolve-se em dois hospedeiros, no hospedeiro vertebrado, e no invertebrado, o mosquito do género *Anopheles*. Como esquematizado na figura I.2., a infecção no hospedeiro vertebrado pelo parasita começa com a picada do mosquito vector que inocula esporozoítos. Estas formas móveis do parasita alcançam a corrente sanguínea rapidamente e seguem para o fígado, onde invadem os hepatócitos (infecção assintomática). No seguimento da infecção os esporozoítos desenvolvem-se em esquizontes que se rompem e libertam dezenas de milhar de merozoítos (esquizogonia extra-eritrocítica), que posteriormente irão invadir e desenvolver-se nos eritrócitos. Após a invasão dos eritrócitos, os parasitas sofrem multiplicação assexuada (esquizogonia eritrocítica), onde o estadio de anel evolui para trofozoíto, que amadurece transformando-se em esquizonte, posteriormente dá-se a sua rutura libertando merozoítos (Greenwood et al., 2008; CDC, 2012). A possibilidade de transmissão de parasitas da malária aos vectores começa no interior do hospedeiro vertebrado, quando uma minoria de parasitas haploides assexuados inicia a gametocitogénese. Os processos que levam à diferenciação sexual são ainda pouco compreendidos, no entanto, pensa-se que se devem a altos níveis de parasitémia, anemia, respostas imunes, quimioterapia, entre outros factores ambientais (Baton & Ranford-Cartwright, 2005).

Introdução

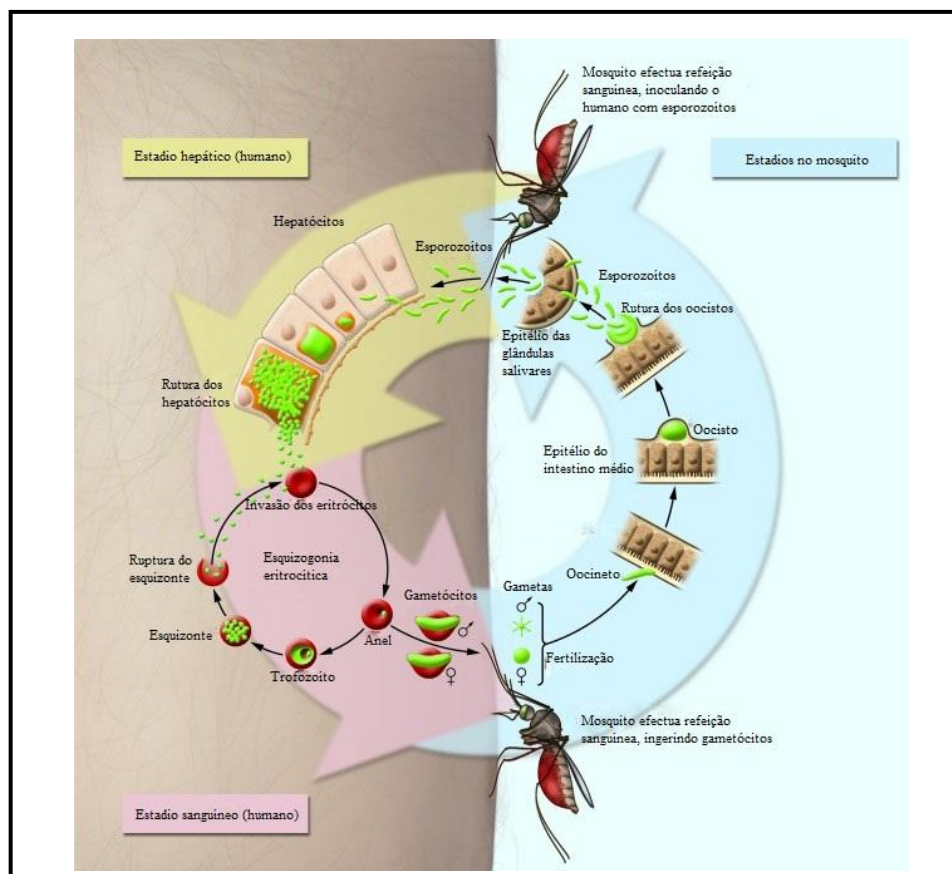


Figura 0 Ciclo de vida de *Plasmodium* spp, em ambos os hospedeiros. Adaptado de Neill, 2011.

O ciclo esporogónico inicia-se quando os gametócitos são ingeridos pelos mosquitos durante a refeição sanguínea. Apesar das espécies do género *Plasmodium* serem evolutivamente divergentes, as transformações dentro do vector são muito conservadas. Apenas os gametócitos sobrevivem no intestino médio do mosquito, todas as outras formas são destruídas, e pouco tempo após a ingestão de sangue o ambiente físico e químico do intestino médio leva à diferenciação dos gametócitos ingeridos em gâmetas femininos e masculinos. Estes dão origem ao zigoto quando o microgameta (móvel) penetra no macrogameta, no lúmen do intestino médio. Os zigotos formados desenvolvem-se em oocinetos móveis, que invadem e atravessam o epitélio do intestino médio aproximadamente 24 h após a ingestão de sangue (dependendo da combinação de espécies de hospedeiros/parasita). Os atravessam o epitélio do intestino médio, sofrem meiose e, ao chegar ao lado basal, transformam-se em oocistos, no seu interior o parasita sofre várias séries de mitose originando milhares de esporozoítos haploides,

Introdução

que são libertados para o hemocelio, cerca de 2 semanas após a infecção. Os esporozoítos viajam através da hemolinfa e invadem as glândulas salivares (figura I.3). Nas glândulas salivares atravessam o epitélio glandular onde maturam, podendo desta forma ser transmitidos a um novo hospedeiro vertebrado durante a refeição sanguínea (Service, 1980; Bladin & Levashina, 2004; Baton & Ranford-Cartwrith, 2005; Riehle et al., 2006; Whitten et al., 2006; Yassine & Osta, 2010; CDC, 2012).

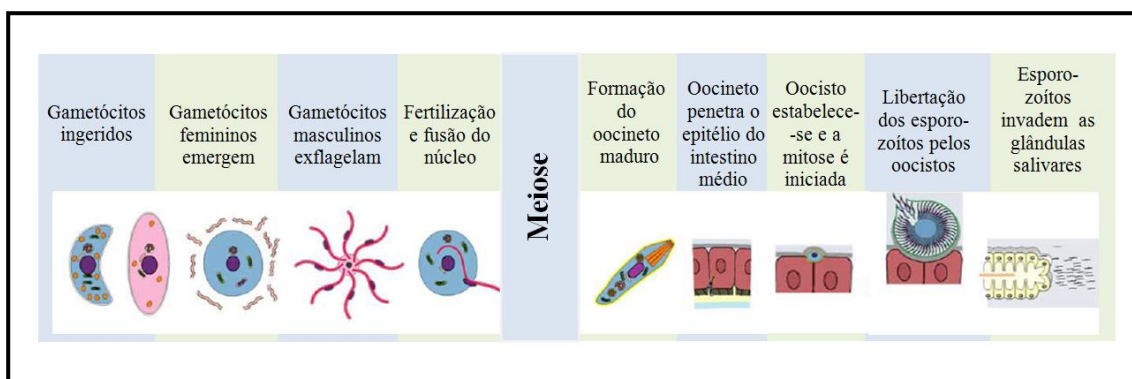


Figura I.3. Dinâmica do desenvolvimento do parasita da malária no mosquito. Adaptado de Baton & Ranford-Cartwrith, 2005.

I.3 - *Anopheles gambiae* Giles, 1902

A transmissão de *Plasmodium* spp. aos humanos deve-se à picada infecciosa de mosquitos fêmea do género *Anopheles*, que está filogeneticamente organizado da seguinte forma: Super-reino Eukaryota, reino Metazoa, filo Arthropoda, super-classe Hexapoda, classe Insecta, sub-classe Neoptera, infraclasse Endopterygota, ordem Diptera, sub-ordem Nematocera, infra-ordem Culicimorpha, super-família Culicoidea, família Culicidae, sub-família Anophelinae, género *Anopheles*, sub-género *Cellia*, espécie *Anopheles gambiae* s.s. (NCBI Taxonomy Browser, 2012).

Este mosquito é o vector mais eficiente de malária em todo o mundo, pica principalmente das 22 às 05 h, dentro das habitações (endofágico). Os seus hábitos de descanso colocam-no dentro das habitações, sendo desta forma também endofílico. As suas preferências alimentares são sangue humano, e é exatamente devido ao facto de ser tão antropofílico que é o maior, e melhor transmissor de malária (Service, 1980; Pates & Curtis, 2005; Yassine & Osta, 2010; Riehle et al., 2011).

I.3.1 - Distribuição geográfica

Os mosquitos de género *Anopheles* apresentam distribuição mundial, ocorrendo não apenas nas áreas tropicais mas também em zonas temperadas, estão no entanto, ausentes desde 1250 m abaixo do nível do mar (em minas) até 5500 m de altitude e na Antártida (figura I.4). Estes mosquitos, transmissores de malária, são encontrados não só em áreas endémicas de malária, mas também em áreas onde esta foi eliminada, motivo pelo qual persiste o perigo de reintrodução (Service, 1993; CDC, 2012).

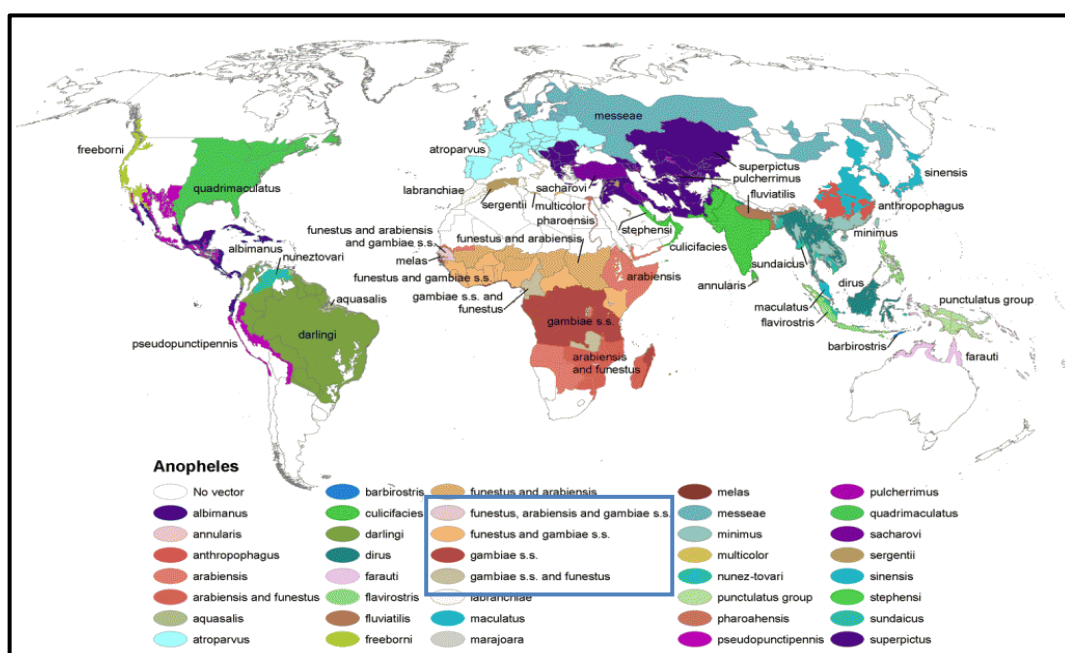


Figura I.4. Distribuição mundial de mosquitos do género *Anopheles*. Rectângulo azul indica a espécie *Anopheles gambiae*. Adaptado de Kiszewski et al., 2004.

I.3.2 - Ciclo de Vida

O ciclo de vida dos mosquitos passa-se em dois meios distintos; os adultos vivem no meio aéreo, mas todas as formas imaturas evoluem em coleções de água. Após a cópula e a refeição sanguínea, as fêmeas de *Anopheles* spp grávidas põem os seus ovos entre 50-200 ovos pequenos (1mm), castanhos ou pretos em forma de barco com flutuadores laterais, permitindo que flutuem na superfície da água (figura I.5(1)). Nos países tropicais eclodem entre 2 a 3 dias, em regiões temperadas pode demorar 2 a 3 semanas, em qualquer dos casos não suportam a dessecação (Service, 1980).

As larvas do género *Anopheles* não têm sifão respiratório, por este motivo

Introdução

colocam-se paralelamente à superfície aquática (figura I.5(2)). São compostas por cabeça, torác e abdômen. Passam por três sucessivas mudas (ecdises) durante o seu crescimento, em que se libertam do seu revestimento quitinoso (ou exúvia larvar). Estas mudas dividem a vida da larva em 4 estádios (ou fases larvares). As larvas alimentam-se por filtração de bactérias, leveduras, protozoários e outros micro-organismos. Os biótopos larvares (criadouros) são, na região Afrotropical, caracteristicamente constituídos por pequenas coleções temporárias de água doce, no solo, frequentemente água das chuvas, sendo esta parada, límpida com pouca matéria orgânica e sempre bem exposta à luz solar, normalmente disposta em criadouros naturais como, leitos e margens de cursos de água a secar, ou em criadouros artificiais tais como, pegadas, trilhos de veículos, entre outros. Nos países tropicais os períodos larvares duram 7 dias, em regiões temperadas podem durar 2 a 4 semanas; no final do 4º estadio a larva transforma-se em pupa (Service, 1980; Lehane, 2005).

As pupas apresentam formato de vírgula, pois a cabeça e o tórax encontram-se fundidos formando um cefalotórax (Figura I.5(3)). Não se alimentam durante a sua existência. Costumam flutuar na superfície da água. O período pupal dura 2 a 3 dias nas regiões tropicais e 1 a 2 semanas nos climas temperados. O processo de eclosão dura alguns minutos e, se bem-sucedido, o novo adulto repousa algum tempo sobre a exúvia pupal para endurecer as suas asas, e depois voa (Service, 1980).

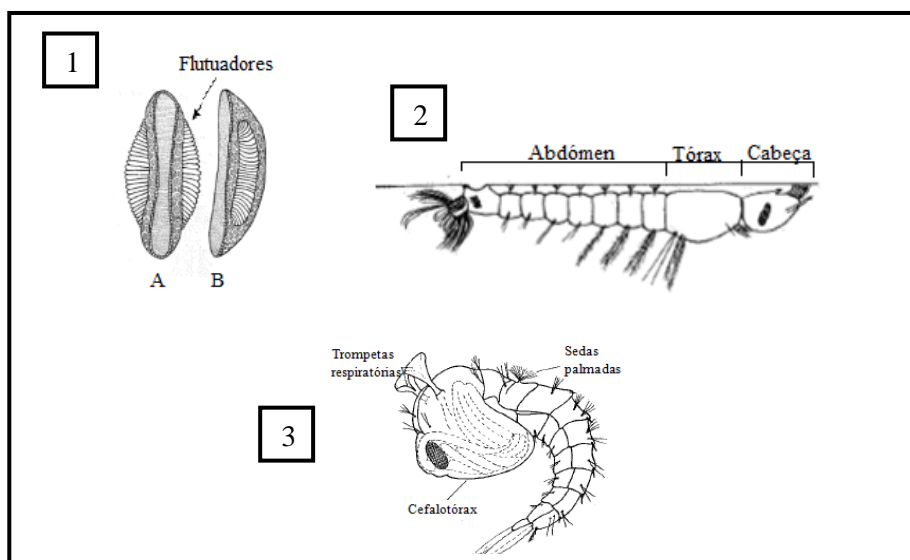


Figura I.5. (1) Vista dorsal (a) e lateral (b) de um ovo de *Anopheles*; (2) Larva de *Anopheles* à superfície da água, respirando através dos espiráculos situados no 8º segmento; (3) Pupa de *Anopheles*. Adaptado de Service, 1980.

Introdução

Morfológicamente os adultos apresentam o corpo dividido em cabeça, tórax e abdômen. Os mosquitos são dípteros delgados e relativamente pequenos (3-6 mm), com patas longas e finas, corpo com escamas características, mais ou menos abundantes. Quando se encontram em posição de descanso, o seu corpo faz um ângulo com a superfície onde está apoiado (figura I.6(1)). O seu dimorfismo sexual é principalmente diferenciado através das antenas, que nas fêmeas apresentam pequenos pelos entre os segmentos, constituindo uma antena pilosa, enquanto que, nos machos as antenas têm muitos e grandes pelos, tendo a antena uma aparência plumosa (figura I.6(2)). Uma característica distintiva dos anofelíneos comparativamente a outros mosquitos, encontra-se nas asas que e nos palpos (figura I.6(2)) (Service, 1980; Lehane, 2005).

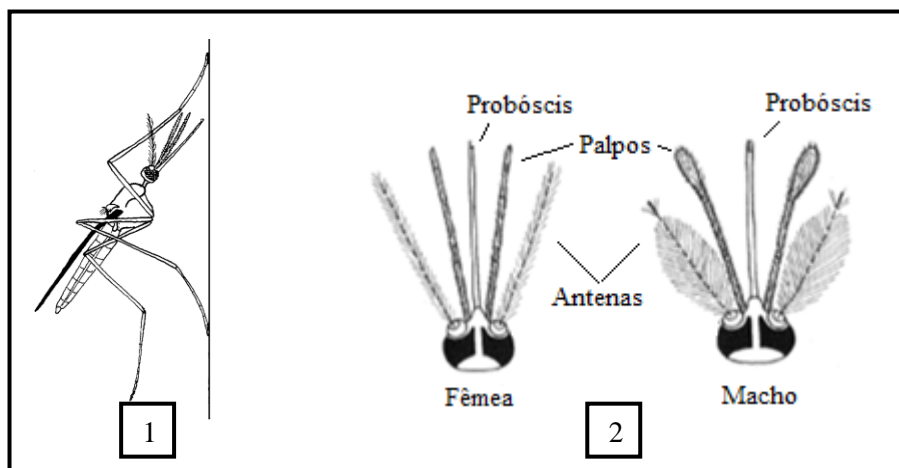


Figura I.6. (1) Posição de repouso de um anofelíneo. **(2)** Diagrama da cabeça de anofelíneos adultos, fêmea e macho, mostra diferenças nos palpos e nas antenas. Os palpos costumam estar próximos do probóscis, na imagem estão separados para propósito de visualização. Adaptado de Service, 1980.

As fêmeas copulam logo após emergência, alimentando-se nesse mesmo dia num hospedeiro vertebrado. A cópula é realizada em enxames e dão-se durante os crepúsculos vespertinos e matutinos, os ovos maturam rapidamente e cerca de 2 a 3 dias as fêmeas efetuam a respectiva postura. Tendo oportunidade alimentam-se novamente reiniciando o ciclo, efetuando por norma apenas uma refeição sanguínea por ciclo gonotrófico. As fêmeas podem sobreviver até um mês (ou mais, em cativeiro), mas a maioria não vive mais do que 1 a 2 semanas na natureza. As hipóteses de sobrevivência dependem da temperatura e da humidade, mas também da sua capacidade de obter com sucesso uma refeição sanguínea. Os machos vivem cerca de uma semana, alimentando-

se de néctar e outras fontes de açúcar (Service, 1980; CDC, 2012).

I.3.3 - Imunidade no mosquito

A defesa do mosquito contra patógenos envolve não só barreiras estruturais, tais como, o exoesqueleto e a matriz peritrófica, que é secretada após a alimentação, mas também uma grande variedade de mecanismos celulares e humorais realizados por vários órgãos e tipos de células (Whitten et al., 2006; Yassine & Osta, 2010). Desta forma pode-se organizar o sistema imunitário de *Anopheles* spp, de forma simplificada, em 4 etapas funcionais: reconhecimento de patógenos, cascatas de amplificação de sinal, vias de sinalização imunológica, e moléculas e mecanismos efetores (figura I.7) (Beckage, 2008). Onde se podem observar várias respostas que incluem, entre outras, fagocitose por hemócitos, cascatas proteolíticas, promoção da melanização extracelular e coagulação ou activação de cascatas de sinalização intracelular (Whitten et al., 2006; Yassine & Osta, 2010). Em cada fase do desenvolvimento da população de parasitas observam-se “bottlenecks”, ou seja, uma diminuição do número de parasitas. Estima-se que dos cerca de 10000 gametócitos ingeridos na refeição sanguínea, em média, apenas 1000 oocinetos se desenvolvem com sucesso e destes menos de 5 sobrevive ao desenvolvimento em oocistos, mesmo em mosquitos susceptíveis, ou seja, o sistema imunológico do mosquito, através dos mecanismos acima mencionados, limita a infeção por *Plasmodium* spp e apenas uma parte dos parasitas invasores sobrevive à migração através do epitélio do intestino médio (Whitten et al., 2006; Riehle et al., 2006; Barrilas-Mury, 2007; Beckage, 2008). Desta forma o fenómeno de “bottleneck” torna o intestino médio no principal alvo de estudo e intervenção (Wang et al., 2012).

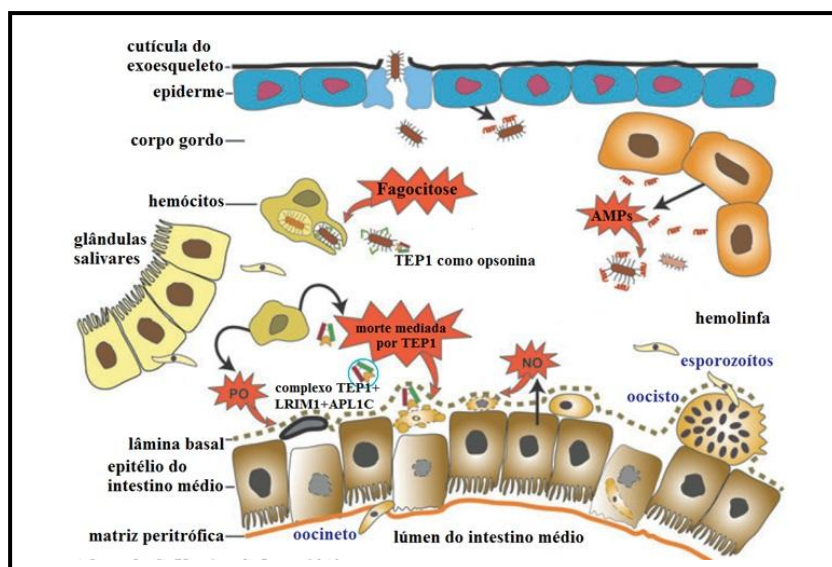


Figura I.7. Representação esquemática das respostas imunológicas efetoras (a vermelho) de *A. gambiae* contra *Plasmodium* spp, compostos por barreiras físicas, respostas imunes locais e sistêmicas. Setas pretas indicam os tecidos que produzem diferentes moléculas efetoras. Adaptado de Yassine & Osta, 2010.

I.3.3.1 - Receptores de reconhecimento padrões (PRRs)

O sistema imunológico inato de vertebrados e invertebrados é ativado quando se dá um reconhecimento de padrões moleculares associados a patógenos (PAMPs) pelos receptores de reconhecimento padrões (PRRs). Através da análise informática do genoma de *A. gambiae* foram identificadas várias famílias ligadas à imunidade codificantes de PRR putativos, tais como, proteínas com repetições ricas em leucinas (LRR), lectinas do tipo C (CTL) e proteínas contendo tioester (TEP). Estudos posteriores identificaram quatro PRRs putativos com efeitos opostos sobre oocinetos de *Plasmodium berghei*: TEP1 e LRIM1 (Molécula 1 rica em leucina) que atuam como factores antiparasitários, enquanto as proteínas CTL4 e CTLMA2 apresentam um efeito protetor (Yassine & Osta, 2010).

A TEP1 é segregada por hemócitos, onde se torna madura proteoliticamente e se liga à superfície dos oocinetos, no lado basal do epitélio do intestino médio do mosquito, mediando a sua morte através de um mecanismo específico. Esta proteína funciona como uma opsonina ligando-se covalentemente à superfície de bactérias Gram-negativas e Gram-positivas, desencadeando a sua eliminação por fagocitose. A proteína

LRIM1 e a APL1C formam obrigatoriamente um heterodímero com uma ligação dissulfureto, que interage posteriormente com TEP1 (figura I.7). Estudos posteriores sugeriram que ambos LRRs atuam como proteínas complementares na especificidade de TEP1, não sendo necessários para a morte mediada por TEP1 (Yassine & Osta, 2010; Bladin & Levashina, 2004; Whitten et al., 2006; Marois, 2011).

As proteínas CTL4 e CTLMA2 são proteínas solúveis presentes na hemolinfa sob a forma de heterodímero com ligação dissulfureto, sendo necessária para a sobrevivência dos mosquitos após a infecção por bactérias Gram-negativas. O knock-down de CTLMA2 e CTL4 resulta em melanização maciça dos oocinetos e numa dramática redução do número de oocistos (Yassine & Osta, 2010).

I.3.3.2 - Modulação e transdução de sinal

Em insectos, o reconhecimento de PAMPs pelos PRRs geralmente desencadeia a ativação de cascatas de proteases de serina que amplificam o sinal de perigo retransmitindo-os para os mecanismos efectores a jusante, tais como a coagulação, a síntese de peptidos antimicrobianos e melanização, responsáveis pela eliminação do invasor (Yassine & Osta, 2010; Cirimotich et al., 2010).

A análise comparativa dos genomas de *A. gambiae* e de *Drosophila melanogaster* permitiu a identificação de alguns dos componentes das vias Toll e IMD de *D. melanogaster* (figura I.8). Apesar da maioria dos componentes intracelulares destas duas vias ser conservada no mosquito, não existe um ortólogo do factor de transcrição Nf-kB de *D. melanogaster*. No entanto, o genoma do mosquito codifica dois factores de transcrição para NF-kB: REL1 e REL2, ortólogos de *D. melanogaster*, Dorsal e Relish respectivamente (Yassine & Osta, 2010)

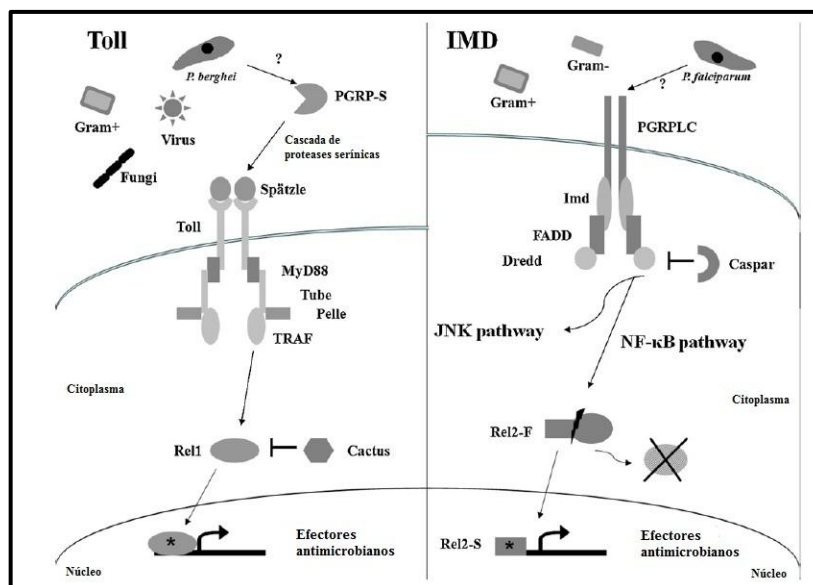


Figura I.8 Vias de sinalização IMD e Toll, envolvidas na defesa contra *Plasmodium*. Adaptado de Cirimotich et al., 2010.

Os factores de transcrição REL1 e REL2 interferem na defesa contra *Plasmodium* spp através da regulação dos níveis de expressão basal dos principais genes antiparasitários, tais como, TEP1, LRIM1 e APL1C. Evidências recentes destacam o papel de STAT (transdutor de sinal e ativador da transcrição) na redução de *P. berghei* e *P. falciparum* no intestino médio do mosquito. O mosquito *A. gambiae* tem dois genes STAT que parecem ter sido originados por duplicação genética (AgSTAT-A e AgSTAT-B) (Yassine & Osta, 2010; Cirimotich et al., 2010).

I.3.3.3 - Mecanismos efectores

A síntese de AMPs (péptidos antimicrobianos) é considerado um ponto importante na resposta humoral dos insectos contra infecções microbianas, estes são produzidos sistemicamente pelo corpo gordo e daí secretados para a hemolinfa, sendo também produzidos localmente pelo epitélio (figura I.7). O genoma de *A. gambiae* codifica várias famílias de genes AMP, incluindo quatro genes cecropina (CEC), quatro defensinas (DEF), uma atacina e uma gambicina (GAM). Ensaios antimicrobianos utilizando AMPs purificados revelou que CEC1 e GAM têm um largo espectro de atividade contra microrganismos do tipo Gram; CEC1 é ativo contra leveduras e GAM é

parcialmente letal em culturas *in vitro* de oocinetos de *P. berghei*. O AMP DEF1 é principalmente ativo contra bactérias Gram-positivas e algumas espécies de fungos filamentosos. Em *A. gambiae*, tanto REL1 como REL2 controlam a expressão de CEC1, GAM e DEF1 (Bladin & Levashina, 2004; Beckage, 2008; Yassine & Osta, 2010).

A melanização é uma resposta de defesa imunológica única para artrópodes, envolve a produção de melanina e a sua deposição sobre a superfície de microrganismos invasores, e está envolvida ainda em vários mecanismos, incluindo a cicatrização de feridas, esclerotização e pigmentação da cutícula (Yassine & Osta, 2010). A produção de melanina é ativada rapidamente devido a lesão física e pela presença de parasitas e micro-organismos ou produtos derivados dos mesmos (Cerenius et al., 2010). A melanização é mediada pela fenoloxidase (PO) (forma activada da profenoloxidase (PPO)) a sua activação, na hemolinfa, e regulada por uma cascata de proteases serínicas com domínios clip (CLIP) (Barrilas-Mury, 2007; Whitten et al., 2006; Cerenius et al., 2010). No entanto, a melanização é dispensável para a defesa de *A. gambiae* contra bactérias, apesar destas desencadearem a ativação de PPO na hemolinfa (Yassine & Osta, 2010).

A fagocitose é uma resposta imune celular evolutivamente conservada em mosquitos, segundo a qual os hemócitos reconhecem, internalizam e destroem patogenios e células apoptóticas (figura I.7). Foram caracterizados três tipos de hemócitos em mosquitos adultos: os oenocitóides, pro-hemócitos e os granulócitos, que são as únicas células fagocíticas. É através da ligação da TEP1 a bactérias Gram-positivas e Gram-negativas que estes microorganismos são marcados para remoção e destruição por fagocitose (Bladin & Levashina, 2004; Beckage, 2008; Yassine & Osta, 2010).

I.3.4 - Coagulação

A coagulação é um mecanismo essencial que mantém a integridade da barreira epitelial após a danificação do tecido sendo uma das primeiras respostas à lesão em insectos, onde, tal como noutros animais, o coágulo impede a infecção parando o sangramento, contribuindo também para cicatrização de eventuais feridas (Agianian et al., 2007; Dushay, 2009; Loof et al., 2011). O sistema circulatório aberto dos artrópodes

permite que a coagulação seja mais exuberante de forma a curar em poucos segundos as feridas, limitando a perda de fluido, restaurando o esqueleto hidrostático e aprisionando microorganismos no local da ferida (Dushay, 2009; Loof et al., 2011). Os principais intervenientes neste processo são as células sanguíneas e os factores solúveis secretados por outros órgãos, tais como, o fígado ou o equivalente nos insectos, o corpo gordo (Loof et al., 2011).

Estudos de microscopia óptica, microscopia eletrónica, e estudos *in vivo* da hemolinfa larvar de *Galleria mellonella* (traça da cera) sugerem que o envolvimento do conteúdo granular dos hemócitos na coagulação. Foi também verificado que nas larvas de *Locusta migratória* (gafanhoto) e *Leucophaea maderae* (barata da madeira), os hemócitos são necessários para o processo de coagulação (Dushay, 2009). Os crustáceos, tais como lagostas e camarões, fazem “crosslinking” de proteínas solúveis, que mostram semelhanças com sequências de proteínas de armazenamento (vitelogeninas). Moléculas individuais de vitelogenina sofrem “crosslinking” por transglutaminase (TGM) originando polímeros que formam a matriz do coágulo (Loof et al., 2011). O sistema de coagulação do caranguejo-ferradura, em contraste ao seu homólogo crustáceo, compreende cascatas proteolíticas, cujos componentes são armazenados na forma inativa dentro de hemócitos granulares (Cerenius et al., 2010).

O processo de coagulação da hemolinfa do caranguejo-ferradura (*Tachypleus sp. Carcinoscopus rotundicauda* e *Limulus polyphemus*) envolve a ativação de uma ou duas cascatas proteolíticas. Ambas as cascatas conduzem à clivagem de coagulogénio em coagulina, de onde resulta um polímero insolúvel (Dushay, 2009; Cerenius et al., 2010; Loof et al., 2011). A TGM libertada pelos hemócitos aumenta a estabilidade do coágulo através do “crosslinking” da coagulina com duas proteínas específicas, a proxina (uma proteína rica em prolina) e a establina (uma proteína rica em cisteína), o que aumenta a estabilidade das fibrilas de coagulação (Cerenius et al., 2010; Loof et al., 2011).

A coagulação em insectos foi originalmente estudada bioquimicamente em espécies que envolvem outro tipo de proteínas de transporte, as lipoforinas, que são o equivalente a LDL (lipoproteína de baixa densidade) e HDL (lipoproteína de alta densidade) em insectos (Loof et al., 2011). Os níveis destas lipoproteínas mostraram-se

reduzidos no soro pós-coagulação de larvas de *L. migratória*, *G. mellonella*, *Periplaneta americana* (barata americana) e *L. maderae*. Posteriormente foram identificadas as apolipoforinas I e II como candidatas a factores de coagulação da hemolinfa de larvas de *D. melanogaster*, sendo que a apolipoforina I foi identificada por “pull-out” em larvas de *A. gambiae*, sugerindo a sua presença no coágulo deste mosquito (Dushay, 2009). Estudos mais recentes em insectos, como mosquitos e *D. melanogaster*, confirmaram os resultados de outros insectos, acrescentando a hexamerina e o seu receptor à lista de proteínas de armazenamento envolvidas na coagulação. Foram também identificados factores de coagulação mais especializados, como a hemolectina e a proteína fondue (de *D. melanogaster*) (Loof et al., 2011).

Uma característica comum entre diferentes espécies de insectos é a exigência de Ca^{2+} para a coagulação da hemolinfa, confirmado pela utilização de um quelante de Ca^{2+} que bloqueou a coagulação em larvas de barata, *G. mellonella*, e *D. melanogaster*. Além disso, a inibição da coagulação por iodoacetamida (um bloqueante de cisteína que também inibe o “crosslinking” de proteínas) na hemolinfa de larvas de *L. maderae* sugere que o ião Ca^{2+} é necessário para a atividade de uma enzima que promove “crosslinking”, como a TGM (Dushay, 2009). A TGM parece contribuir para a coagulação em quase todos os invertebrados (Dushay, 2009; Loof et al., 2011). Em humanos e caranguejos, é necessária a presença de TGM para o endurecimento final do coágulo, mas também da PO. Os mecanismos moleculares que levam à ativação de TGM e se esta atua numa fase tardia da coagulação, como nos humanos, ou se atua durante a formação da matriz do coágulo, tal como nos crustáceos, continua ainda por descobrir (Loof et al., 2011). Mutantes e linhas “knockdown” de *Drosophila* sp. para hemolectina e fondue mostram apenas defeitos hemorrágicos ligeiros e são pouco relevantes para a coagulação, enquanto que os mutantes para PO morrem devido a hemorragia. Larvas com quantidades reduzidas de TGM ou fondue, ou mutantes na ativação de PPO são mais sensíveis a certas infecções, o que apoia a noção de que ambas as atividades também têm uma função imune em *D. melanogaster* (Loof et al., 2011). O silenciamento *in vivo* do gene da proteína TGM tornou estes animais mais suscetíveis a infecções por bactérias (*Vibrio penaeicida*) e também a vírus (vírus da mancha branca) (Loof et al., 2011). Larvas de *Drosophila* sp. com atividade reduzida de TGM apresentam taxas de mortalidade superiores às larvas selvagens, quando

infectadas com *Photorhabdus luminescens*, *S. aureus* ou *Heterorhabditis bacteriophora*. Bactérias injetadas em larvas de *G. mellonella*, *Pieris brassicae* (borboleta do repolho branco) e *D. melanogaster* ficaram retidas na matriz, formada pela desgranulação dos hemócitos (Dushay, 2009). Estudos posteriores em *D. melanogaster* sobre os mecanismos moleculares utilizados pela TGM revelaram que a enzima reconhece superfícies bacterianas e imobiliza bactérias dentro a matriz da hemolinfa (Loof et al., 2011). Este processo envolve o factor de coagulação fondue, que atua como um substrato da TGM (Lindgren et al., 2008; Dushay, 2009; Loof et al., 2011).

A interação de hemócitos e factores de coagulação parece ser uma característica geral da coagulação em insectos, sendo que a transglutaminase, a lipoforina, e a fenoloxidase apresentam-se como os factores de coagulação mais comuns nos insectos, no entanto, em larvas *A. gambiae* apenas foram identificados a lipoforina e PO (Agianian et al., 2007; Dushay, 2009). De todos os diferentes fatores de coagulação em invertebrados e vertebrados, TGM precisa ser destacada, pois é o único factor que tem homólogos em todas as espécies estudadas (Loof et al., 2011).

I.4 - Transglutaminase

O termo transglutaminase EC 2.3.2.13 foi introduzido por Clarke et al. (1957) para descrever a atividade de transamidação observado no fígado dos porquinhos-da-Índia (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004). As TGMs pertencem à superfamília das proteases cisteínicas do tipo papaína e são um grupo amplamente distribuído de enzimas que catalisam modificações pós-traducionais em proteínas através da formação de pontes isopeptídicas (Griffin et al., 2002; Lorand & Graham, 2003; Beninati & Piacentini, 2004). Embora o “crosslinking” de proteínas seja a modificação pós-traducional mais conhecida destas enzimas, estas podem ainda mediar outros três tipos de reação tais como, a transamidação, a esterificação, e a hidrólise (figura I.9). Todas estas reações envolvem uma proteína/péptido que contém um resíduo glutamina (Gln) específico, como substrato “aceitador”, que reage com o resíduo cisteína (Cys) da tríade catalítica da TGM formando uma ligação γ -glutamil- tioéster (Iisma et al., 2009). A transamidação é a reação que efetua uma ligação cruzada de proteínas através da transferência de um grupo acil entre o grupo γ -carboxamida, de

Introdução

uma glutamina, e o grupo ϵ -amino, de uma lisina, resultando numa ligação isopeptídica ϵ -(γ -glutamil)-lisina (figura I.9) (Griffin et al., 2002; Rao et al., 2005; Iisma et al., 2009), através da incorporação de aminas primárias, ao nível das ligações peptídicas de resíduos de glutamina (figura I.9) (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004). Os produtos resultantes deste tipo de reação são altamente resistentes à degradação mecânica e proteolítica (Beninati & Piacentini, 2004; Rao et al., 2005; Iisma et al., 2009). Nas reações de esterificação dá-se a ligação de um segundo substrato “dador”, um álcool (figura I.9). Assim, a ligação tioéster é clivada (etapa de desacilação), ocorrendo a reação de transferência do radical acilo entre o grupo γ -carboxamida do resíduo Gln e o substrato “dador”. Nas reações de hidrólise, esta etapa de acilação inicial é seguida por ataque nucleofílico direto efetuado por uma molécula de água (figura I.9) (Iisma et al., 2009).

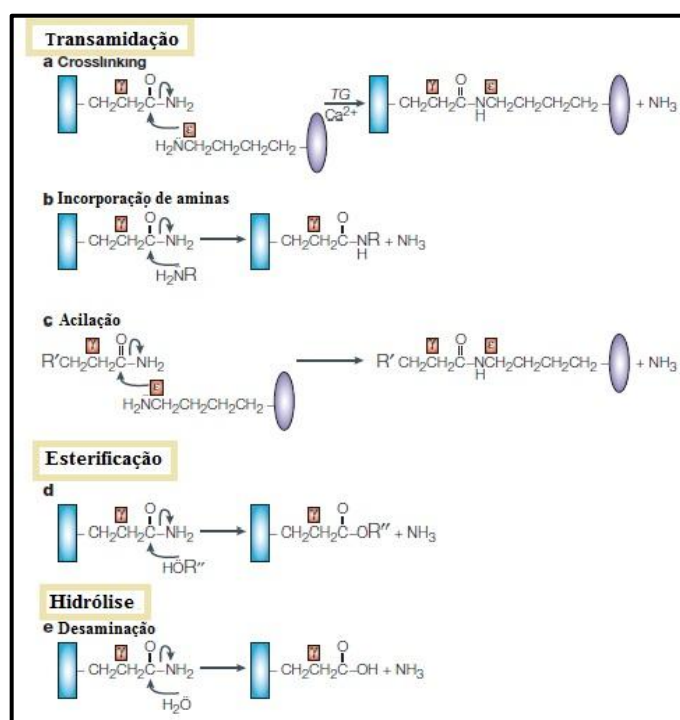


Figura I.9. Várias reações pós-transcricionais catalisadas por TGM. Resíduo dador de lisina (elipse roxa), resíduo aceitador de glutamina (retângulo azul). Adaptado de Lorand & Graham, 2003.

As reações que envolvem proteínas que efetuam ligações cruzadas e poliamidação são relevantes *in vivo* e a competição por aminas pode acontecer em células cujas funções fisiológicas sejam importantes. É nestas situações que estas

proteínas funcionam como uma “cola biológica”, como por exemplo, intervindo na morte celular, nas interações da matriz celular, na estabilização da epiderme, entre outras (Griffin et al., 2002) e por esse motivo têm recebido muita atenção pelas indústrias de biotecnologia que apostam na pesquisa da TGM (Beninati & Piacentini, 2004).

I.4.1 - Estrutura e propriedades catalíticas

Estruturalmente estas enzimas são compostas por quatro domínios sequenciais e estruturalmente distintos denominados por, domínio 1 ou N-terminal, com estrutura em β -sandwich; domínio 2, ou domínio central, onde se encontra a tríade catalítica Cys²⁷⁷, His³³⁵ (histidina) e Asp³⁵⁸ (aspartato) ou Cys, His, asparagina (Asn), presente em todos os membros da superfamília TGM e um resíduo de triptofano (Trp) conservado que estabiliza o estado de transição; e ainda dois domínios C-terminal com estrutura de barril- β (figura I.10) (Griffin et al., 2002; Lorand & Graham, 2003; Beninati & Piacentini, 2004; Iisma et al., 2009). O domínio 1 consiste num loop inicial flexível, o domínio 2 a cadeia peptídica dobra-se em duas estruturas- β que se movem para cima e para baixo ao longo da superfície do domínio central, que contém os aminoácidos Ser¹⁷¹ e Lys¹⁷³, envolvidos na ligação a GTP (Guanosina trifosfato), tem ainda quatro estruturas- β adicionais e quatro α -hélices (figura I.10). As primeiras três hélices (H₁, H₂ e H₃) estão num arranjo triangular formando o centro catalítico e a última hélice (H₄) está no final do domínio do núcleo e inclui os aminoácidos que estão envolvidos na região da ligação ao Ca²⁺ (Ser⁴⁴⁹, Glu⁴⁵¹ (glutamato) e Glu⁴⁵²) (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004). Como o centro ativo da enzima está localizado profundamente no domínio 2, fica impedido de contactar com substratos devido à sobreposição dos domínios 3 e 4 (Beninati & Piacentini, 2004). Os domínios C-terminais 3 e 4, estão dispostos em barril- β antiparalelos, sendo compostos por seis estruturas- β e uma volta- β (domínio 3) e sete estruturas- β antiparalelas (domínio 4) (figura I.10). Estes domínios C-terminal são importantes na regulação da atividade de transaminação e na atividade de GTPase (e ATPase) (Griffin et al., 2002).

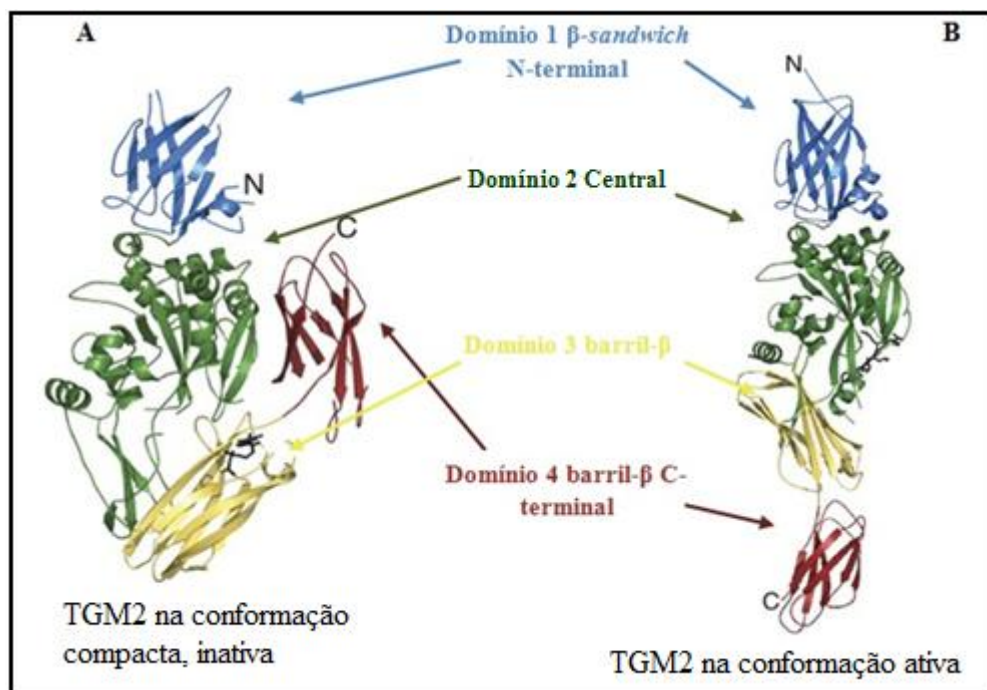


Figura I.10. Estrutura terciária de TGM2 e domínios da proteína. (A) Conformação compacta, inativa de TGM2 (B) Conformação ativa de TGM2. Adaptado de Iismaa et al., 2009.

Os domínios 1, 3 e 4 estão dobrados formando estruturas- β , o domínio 2 apresenta-se com estrutura secundária α -helicoidal (Griffin et al., 2002; Iisma et al., 2009), assumem uma conformação compacta na ausência de Ca^{2+} e quando existe a ligação de GTP (inibe a atividade de TGM), por oposição, na presença de Ca^{2+} a enzima sofre uma mudança conformacional evoluindo para uma estrutura estendida elipsóide tornando-se ativa (figura I.10) (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004; Iisma et al., 2009). No entanto, o nível do ião Ca^{2+} necessário para a activação da enzima é sempre suprafisiológico, por esse motivo a ativação das TGMs só se dá quando existe uma alteração nos mecanismos homeostáticos (Griffin et al., 2002; Lorand & Graham, 2003).

I.4.2 - Distribuição de TGM nos seres vivos

Desde que as TGMs foram descobertas, várias proteínas com atividade deste tipo foram descritas em microrganismos, plantas, invertebrados, anfíbios, peixes e aves (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004), tendo diversificado mais em vertebrados do que em invertebrados (Loof et al., 2011).

Introdução

Análises filogenéticas de várias TGMs conhecidas de bactérias, artrópodes, helmintas, e mamíferos mostraram que estas enzimas estão distantemente relacionadas, e que no geral, bactérias e helmintas formam um grupo diferente e separado das TGMs de mamíferos sugerindo, respectivamente, a existência de uma origem evolutiva em procariotas e outra em invertebrados (figura I.11(1)) (Rao et al., 2005). Neste último grupo existe uma grande conservação da sequência, ou seja, uma grande preservação da estrutura secundária dos resíduos que indica que todos os membros da superfamília TGM podem partilhar a estrutura terciária de quatro domínios (já descrito em TGM humanas e na TGM de besugo). Pode-se observar a diversificação em dois ramos do gene ancestral (Figura I.11(2)). Apesar das semelhanças na organização dos genes que codificam TGMs, as sequências 5' e os mecanismos de regulação transcricional não são homólogos (Lorand & Graham, 2003).

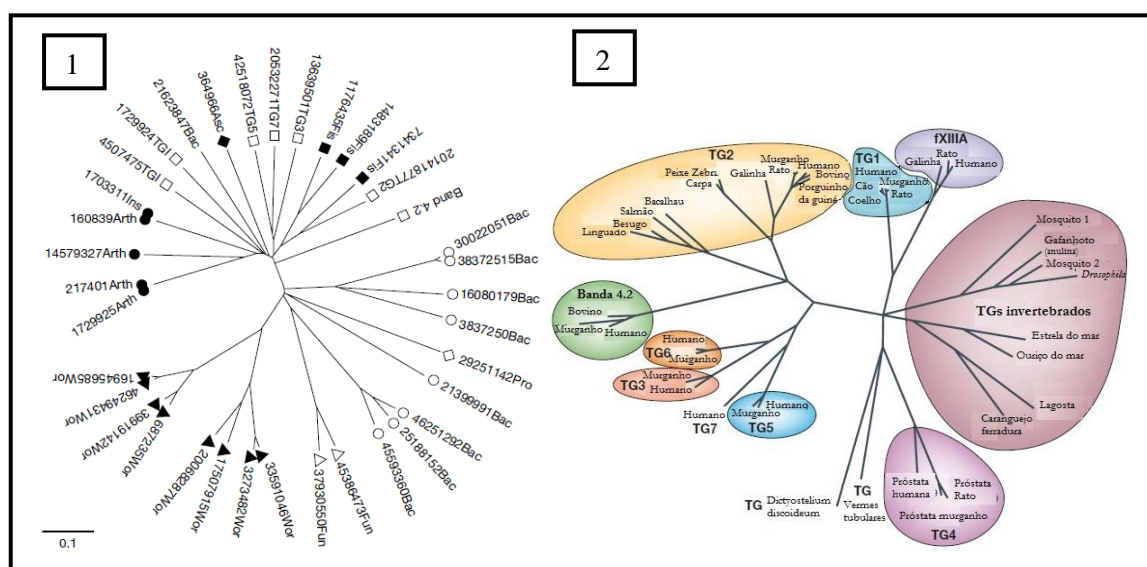


Figura I.11. (1) Árvore filogenética construída usando sequências de aminoácidos de TGM que mostra a relação entre várias TGM de bactérias (Bac), fungos (Fun), protozoários (Pro), artrópodes (Arth), insectos (Ins), ascídia (Asc), helmintas (Wor), peixes (Fis) e mamíferos (TGM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e Band 4.2). Fonte: Rao et al., 2005; **(2)** Árvore filogenética de alinhamento comparativo de TGMs de humanos (TG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Banda 4.2 e FXIIIa) e TGMs de invertebrados, outros mamíferos, protistas, helmintas e peixes. Adaptado de Lorand & Graham, 2003.

Em mamíferos, particularmente em humanos foram identificadas, ao nível genómico, nove isoenzimas TGM distintas codificadas em genes separados com grande homologia entre si (tabela I.1), no entanto, apenas seis foram até ao momento isoladas e caracterizadas ao nível proteico após purificação, quer a partir de fontes naturais quer a

partir de proteínas recombinantes (Griffin et al., 2002; Rao et al., 2005; Beninati & Piacentini, 2004).

Apesar de a TGM não ser normalmente secretada e o mecanismo da sua libertação a partir de células permanecer pouco claro, a sua presença no espaço extracelular está bem documentada, pois o FXIII circula no plasma sanguíneo, TGM4 é um componente do sémen e TGM2 é expresso na superfície de muitas células (tabela I.1) (Griffin et al., 2002; Lorand & Graham, 2003; Beninati & Piacentini, 2004). Foi inicialmente reportado por Fesus et al. (1987) que TGM2 poderia estar envolvida na morte celular por apoptose. Estudos subsequentes sugeriram que esta proteína é importante na estabilização das células apoptóticas através de crosslinking intracelular, prevenindo a perda de conteúdos celulares antes da limpeza fagocitária, no entanto, existem evidências que quando se dá uma perturbação na homeostase de Ca^{2+} , pode existir "crosslinking" intracelular massivo resultando em morte celular (Griffin et al., 2002; Beninati & Piacentini, 2004). Apenas TGM2 tem mostrado função de proteína G, adicionalmente FXIII-A e TGM2 também funcionam como proteínas adaptadoras facilitando a interação com a matriz durante a adesão celular (Iisma et al., 2009). A desregulação da atividade da TGM está associada a grandes perturbações nos mecanismos homeostáticos celulares resultando em várias doenças no homem, tais como, doenças autoimunes, doenças infecciosas, entre outras (Beninati & Piacentini, 2004).

Já foram identificadas as TGM de lagosta, caranguejo-ferradura, gafanhoto, estrela-do-mar (*Asterina pectinifera*), *D. melanogaster*, camarão-tigre e *A. gambiae* (tabela I.2). Na estrela-do-mar e em gafanhotos, as TGM tem um papel no desenvolvimento embrionário, o que requer uma extensa remodelação da matriz extracelular (Chen et al., 2005). A nTGM da estrela-do-mar é semelhante às TGM dos vertebrados e artrópodes. A sua massa molecular encontra-se dentro do intervalo 75-90 kDa conhecido para as TGM destes organismos (tabela I.2). A propriedade exclusiva da nTGM, que não foi encontrada noutras TGM, é o facto de a sua distribuição estar confinada ao núcleo (Sugino et al., 2002).

Introdução

Tabela I.1 – Caracterização das TGMs identificadas em eritrócitos de mamíferos. Adaptado de Griffin et al., 2002.

TGM	Nome	Gene	Massa molecular (KDa)	Actividade	Funções
FXIIIa	Factor estabilizador de fibrina	F13A1	83	Coagulação	Coagulação sanguínea e cura de feridas.
TGM1	TGM queratinócitos	TGM1	90	Pele	Formação do envelope celular na diferenciação dos queratinócitos
TGM2	TGM tecidual	TGM2	80	Ubíqua	Morte e diferenciação celular, estabilização da matriz, proteína de adesão
TGM3	TGM epidérmica	TGM3	77	Pele	Formação do envelope celular durante a diferenciação dos queratinócitos.
TGM4	TGM prostática	TGM4	77	Próstata	Função reprodutiva envolvendo coagulação do sémen (roedores)
TGM5	TGM X	TGM5	81	Pele	Diferenciação epidérmica.
TGM6	TGM Y	TGM6		Desconhecida	Não está caracterizada.
TGM7	TGM Z	TGM7	80	Testículos, pulmões	Não está caracterizada.

Em camarões (*Penaeus monodon* e *Marsupenaeus japonicus*), a coagulação é iniciada pela ativação das células hialinas que liberam o seu conteúdo, incluindo as enzimas de coagulação. As TGM de *P. monodon* polimerizam as proteínas de coagulação formando um gel. Quando purificadas apresentam-se como dímeros fracamente associados, como a subunidade A da FXIII dos mamíferos, e são relativamente instáveis depois da sua ativação por Ca^{2+} . As TGMs STGM I e Mj-TGMH foram identificadas como funcionais nas duas espécies de camarão *P. monodon* e *M. japonicus* (tabela I.2) (Yeh et al., 2006; Chen et al., 2005). Noutra espécie de camarão (*Fenneropenaeus chinensis*) a expressão do gene FcTGM foi maioritariamente associada a hemócitos, especialmente a hemócitos do órgão linfóide; a expressão de FcTGM nestes tecidos mostrou perfis diferentes após a injeção de bactérias inativadas, sugerindo uma ativação devido à infecção e consequentemente um papel na imunidade deste artrópode (tabela I.2) (Liu et al., 2007).

Introdução

Tabela I.2 – Caracterização de TGM identificadas em invertebrados. Adaptado de Sugino et al., 2002; Yeh et al., 2006; Liu et al., 2007; Rogers et al., 2009; Shibata et al., 2010; Wang et al., 2010.

TGM	Organismo	Gene	Massa molecular (KDa)	Atividade	Função
<i>nTGM</i>	<i>Asterina pectinifera</i>	BAB20439	83.1	Células embrionárias	Desenvolvimento
STGM I	<i>Penaeus monodon</i>	AY074924	110.6	Hemócitos jovens e células em mitose de vários tecidos	Proliferação celular
STGM II	<i>Penaeus monodon</i>	AY771615	84.2	Hemócitos e músculo	Coagulação da hemolinfa
Mj-TGMH	<i>Marsupenaeus japonicus</i>	AB162767	84.9	Ubíqua	Coagulação da hemolinfa
FcTGM	<i>Fenneropenaeus chinensis</i>	DQ318855	85	Hemócitos, órgão linfóide	Defesa imunitária
CG7356	<i>Drosophila melanogaster</i>	CG7356	87	Ubíqua	Coagulação da hemolinfa; defesa imunitária; morfogénese e esclerotização cuticular.
AGAP009099	<i>Anopheles gambiae</i>	AGAP009099	27.1	MAGs	Coagulação do líquido seminal; formação do “mating plug”

Em *Drosophila* sp, a TGM é codificada por um único gene e foi sugerido que esta é expressa por hemócitos, enquanto que a proteína fondue é expressa pelo corpo gordo (Lindgren et al., 2008). Quando se dá o contacto de bactérias com a hemolinfa existe uma resposta quase instantânea produzida pela TGM, conduzindo à formação de pequenos agregados levando ao sequestro dos invasores pela matriz coágulo, tendo a TGM, neste caso, uma função de defesa imunitária (figura I.12; tabela I.2) (Wang et al., 2010).

A pesquisa de genes que codificam para TGMs nos genomas dos culicíneos *Ae. aegypti* e *Culex quinquefasciatus* mostrou que estes mantêm sintenia parcial (propriedade de dois ou mais genes estarem localizados no mesmo cromossoma) com os genes de *A. gambiae*. A análise filogenética de TGMs de insectos revelou que

Introdução

AGAP009100, *Aedes* 1, e *Culex* 1 com a única TGM de *Drosophila* sp se encontram no mesmo cluster, sugerindo que estes genes podem reter a função ancestral. AGAP009098 está localizada no segundo cluster com as TGMs de *Aedes* 2 e *Culex* 2 formando um grupo de TGM específica de mosquito (figura I.13) (Rogers et al, 2009).

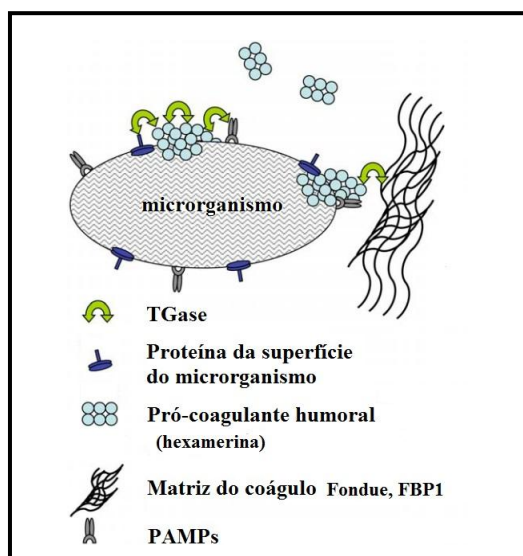


Figura I.12. Mecanismo putativo de imobilização de microrganismos no coágulo pela atividade da TGM. Adaptado de Wang et al., 2010.

O mosquito *A. gambiae* tem três genes codificantes de TGM (AGAP009098, AGAP009099 e AGAP009100, designados por AgTGM98, AgTGM99 e AgTGM100, respectivamente), agrupados no braço do cromossoma 3R. O gene AGAP009099 é expresso exclusivamente nas MAGs (glândulas auxiliares masculinas), enquanto que os genes AGAP009098 e AGAP009100 são expressos ubiquamente e em níveis bastante inferiores. Os altos níveis de atividade de TGM observada nas MAGs dos mosquitos machos de *A. gambiae* suscitaram a necessidade de uma investigação mais aprofundada e os resultados indicam que AGAP009099 é a responsável pela atividade de TGM detectada nas MAGs, sendo, em conjunto com uma proteína rica em Gln denominada pluguina, responsável pela coagulação das secreções das MAGs (tabela I.2) (Rogers et al., 2009).

Silveira et al. (2012) injectaram um inibidor de TGM no hemocélio de mosquitos infectados com *P. berghei*, demonstraram aumentos na taxa de infecção e na carga de oocistos. Adicionalmente, análises de expressão relativa dos genes que codificam para estas enzimas em mosquitos infectados, pareceram apontar para uma

Introdução

regulação diferencial durante a infecção, coincidindo temporal e espacialmente com a invasão de vários tecidos do mosquito, durante o desenvolvimento de *P. berghei* em *A. gambiae*.

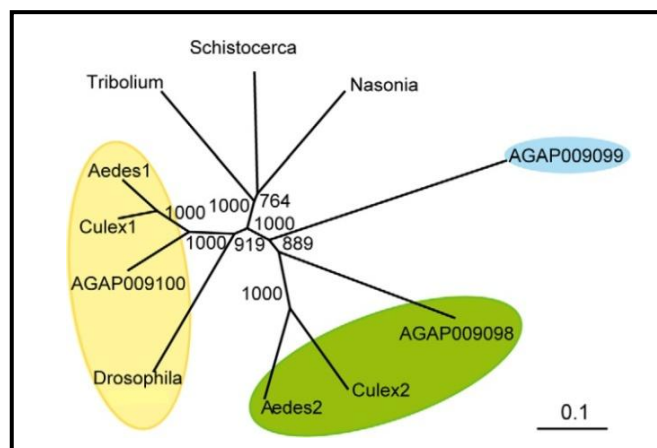


Figura I.13. Análise filogenética de TGM de insetos. Fonte: Rogers et al., 2009.

Ao comparar as TGMs de *A. gambiae* com TGMs já caracterizadas, verificou-se que os requisitos estruturais para a atividade TGM e a ligação ao Ca^{2+} são conservados. Os resíduos da tríade catalítica são conservados em ambas as TGMs em estudo deste mosquito (AGAP009098 e AGAP009100), incluindo o resíduo de triptofano. Além disso, o domínio 2 destas duas proteínas é altamente conservado, exibindo cerca de 70% de identidade de sequência com outras TGM. No entanto, AgTGM98 e AgTGM100 não apresentam um local típico de ligação ao Ca^{2+} , tal como a estrutura “EF-hand”, onde se encontra o local de ligação do cálcio e muitas outras proteínas, na realidade AgTGM98 apresenta apenas três dos cinco motivos acima mencionados e AgTGM100 apenas quatro. Nenhuma das duas TGMs, AgTGM98 e AgTGM100, apresentam o motivo de ligação a GTP. Ambas as TGM possuem locais potenciais para N-glicosilação, embora não tenha sido possível identificar uma sequência de secreção típica e um domínio transmembranar, o que significa que provavelmente são proteínas citoplasmática não secretadas. O motivo RGD (Arg-Gli-Asp), que está presente no fibrinogénio, é conhecido por se ligar a integrinas e os receptores específicos da membrana. Este motivo existe na AgTGM100, e é provavelmente essencial para esta proteína se ligar a integrinas e formar complexos com moléculas de adesão desencadeando, possivelmente, certas vias de sinalização (Custódio et al., em preparação).

I.5 - Objectivos

Estudos sobre a regulação diferencial do transcriptoma durante a infecção (Vlachou et al., 2005) e as experiências em curso no nosso laboratório revelaram diferenças na expressão dos genes em mosquitos infectados com *P. berghei* (Custódio et al., em preparação). As funções das TGMs codificadas por estes dois genes não são ainda conhecidas, no entanto, experiências relacionadas com a avaliação do efeito da injeção com oligonucleotídeos com motivos CpGs (citosina - fosfato - guanina) na estimulação do sistema imunitário do mosquito na resposta à infecção com *P. berghei*, demonstraram que o gene AGAP009098 está sobre-expresso e que o silenciamento deste gene conduziu a um aumento da taxa e intensidade de infecção (Silveira et al., 2012).

As TGMs de *A. gambiae* AGAP009098 e AGAP009100 já foram caracterizadas molecularmente por Custódio et al., (em preparação), houve a constatação da expressão ubíqua de AGAP009098 em todos os estádios de desenvolvimento de *A. gambiae*, e da expressão de AGAP009100 a partir do estágio pupa, o que sugere funções em processos biológicos relevantes, por exemplo, na manutenção da sobrevivência do mosquito ao nível da defesa imunitária, ou no desenvolvimento, respectivamente.

A investigação das TGMs de *A. gambiae*, poderá não só ajudar a esclarecer a invasão do intestino médio de *A. gambiae* por *Plasmodium* spp. como permitirá identificar o modo como estas proteínas interagem dentro do mosquito e qual o seu papel a nível da imunidade inata. Além disso, irá abrir mais caminhos de investigação no âmbito do sistema imunológico dos insectos e na forma como diferentes TGMs interagem dentro do mesmo organismo.

Como objetivo do presente trabalho pretende-se caracterizar ao nível bioquímico e histológico as transglutaminases AgTGM98 e AgTGM100 do mosquito *A. gambiae*. Vão ser apresentados na presente tese (1) os modos de produção e purificação de um fragmento da proteína AgTGM98; (2) produção de soro policlonal contra fragmento da proteína AgTGM98; (3) determinação da atividade enzimática de AgTGM; (4) caracterização de AgTGM98 e AgTGM100 nas diferentes fases do ciclo de vida do mosquito e durante a infecção por *P. berghei*; (5) determinação da localização de AgTGM98 e AgTGM100.

II - Materiais e Métodos

II.1 - Materiais

II.1.1 - Material biológico

II.1.1.1 - Larvas e mosquitos de *Anopheles gambiae* ss

Os mosquitos adultos, estádios larvares e pupas *A. gambiae* ss (forma molecular M) Yaounde, foram obtidos no Instituto de Higiene e Medicina Tropical (IHMT). Os mosquitos foram mantidos a 26°C e 75% de humidade relativa num ciclo circadiano com fase diurna/noturna de 12h. As larvas foram criadas em tabuleiros de plástico, numa densidade de aproximadamente 100 larvas/L de água desionizada, sendo alimentadas com uma mistura de alimentos para peixes. Os mosquitos adultos foram alimentados com solução de glicose a 10% até à alimentação de sangue.

II.1.1.2 - Infecção de mosquitos com *Plasmodium berghei*

Murganhos fêmea CD1 (*Mus musculus*), obtidos biotério do IHMT, foram inoculados intraperitonealmente com 107 *P. berghei* GFP CON. Os níveis de parasitemia foram medidos a partir de amostras de sangue da cauda usando esfregaços corados com Giemsa (cora de azul escuro/púrpura a cromatina do parasita). Quando a parasitemia atingiu 10-15% e foi observada exflagelação, os murganhos foram utilizados para infectar mosquitos. Os mosquitos fêmea puderam alimentar-se diretamente dos murganhos infectados 30 a 45 min. As fêmeas não alimentadas foram removidas da gaiola. Os mosquitos fêmea ingurgitados foram mantidos a 19-21°C e 80% de humidade para o desenvolvimento de *P. berghei*.

II.1.2 - Bactérias *Escherichia coli* BL21(DE3) PlysS

Para a produção de proteína recombinante utilizou-se células BL21(DE3) PlysS. Esta estirpe foi escolhida porque são hospedeiros comumente utilizados para a expressão de proteínas recombinantes a partir de plasmídeos pET, têm a vantagem de apresentarem deficiência em ambas as proteases lon e ompT, por serem DE3 são lisogénicas λ DE3, possuindo portanto uma cópia cromossómica do gene RNA polimerase T7 sob o controlo do promotor lacUV5 (adequadas para a produção de proteína a partir de genes clonados em vectores alvo por indução com IPTG (isopropil-

β -D-tiogalactopiranosídeo))), e por fim por serem pLysS esta estirpe expressa lisozima T7, que suprime a expressão basal da RNA polimerase T7, antes da indução, estabilizando assim os recombinantes pET que codificam as proteínas alvo que poderão afectar o crescimento e viabilidade das células (MerkMillipore, 2012).

II.1.3 - Reagentes

Toda a informação sobre os reagentes utilizados, com respectiva descrição da fórmula química e marca utilizados para a realização dos métodos abaixo descritos estão incluídos no anexo 1, tabela A1.1. Toda a informação sobre os kits utilizados estão descritos no Anexo 1, tabela A1.2.

II.1.4 - Equipamentos

Toda a informação sobre os equipamentos utilizados e respectivas marcas, necessários para a realização dos métodos abaixo descritos estão incluídos no Anexo I, tabela A1.3, com excepção do material comumente utilizado na prática laboratorial diária.

II.2 - Métodos

II.2.1 - Transformação de *E. coli* BL21 (DE3) PlyS por choque térmico

As bactérias competentes *E. coli* BL21 (DE3) PlyS foram transformadas com um plasmídeo circular pET-28a(+) (consultar anexo 2) de acordo com o protocolo abaixo descrito.

Deixou-se descongelar as células competentes em gelo, e adicionou-se de seguida a cada 100 μ l de células *E. coli* BL21 (DE3) PlyS, 1 μ l de plasmídeo recombinante pET28_AgTGM98-1, plasmídeo sem inserto (pET-28a(+)), como controlo positivo, e água MiliQ®, como controlo negativo, agitando-se ligeiramente. Incubou-se em gelo durante 30 min e colocou-se imediatamente a 42°C num termobloco, durante 30 seg. Repetiu-se uma incubação em gelo durante 2 min. Após este tempo as células transformadas foram colocadas em meio LB aquecido a 37°C e de seguida foram

incubadas durante 1 h, a 37°C, com agitação vigorosa. Centrifugou-se a 20800 x g durante 1 min e descartou-se o sobrenadante. Ressuspendendo-se o pellet em 100µl de LB. Inoculou-se a suspensão anterior numa placa de LB agar, suplementada com canamicina (Kan; 30ug/ml) e efetuou-se de seguida uma incubação durante a noite a 37°C com agitação, para proporcionar o crescimento de recombinantes.

II.2.2 - Selecção de clones bacterianos recombinantes

A adição do antibiótico Kan ao meio LB sólido permitiu o reconhecimento de clones bacterianos transformados. Assim, as colónias identificadas como possíveis clones recombinantes, obtidos pela inserção de DNA alvo no vector utilizado, foram repicadas com um palito estéril para meio LB sólido suplementado com Kan. Após incubação ON a 37°C as colónias foram analisadas por PCR, para verificação da presença do inserto (consultar III.2.3 e II.2.4).

II.2.3 - Extração de DNA plasmídico

Inocularam-se as colónias identificadas como clones recombinantes, através de repicagem com um palito estéril, em 1,5 ml de meio LB líquido contendo Kan. Incubou-se a 37°C, ON, na incubadora com agitação, até à obtenção de uma cultura bacteriana saturada (com densidade ótica a 600 nm superior a 1,2). Centrifugou-se a 3225 x g, a 4°C durante 5 min e removeu-se o sobrenadante. O DNA plasmídico dos clones recombinantes de interesse foi extraído a partir do sedimento através do kit comercial GenElute™ Plasmid Miniprep Kit, seguindo as instruções do fabricante.

II.2.4 - Amplificação por PCR do DNA plasmídico

Utilizaram-se os primers sintetizados na empresa STAB Vida Lda. com as sequências indicadas na Tabela II.1. As reacções de PCR foram efectuadas em volumes finais de 20 µl, usando 11,5 µl de água MilliQ®; 2 µl de 5x Green GoTaq® Flexi Reaction Buffer; 2 µl de MgCl₂ Solution 25 mM; 2 µl de dNTPs a 10 mM cada; 0,6 µl de cada primer 50 µM e 0,3 µl de GoTaq® Flexi DNA Polymerase (5 U/µl). Posteriormente, adicionou-se 1 µl de DNA plasmídico, previamente obtido, como DNA

molde.

Para a amplificação do DNA utilizou-se num termociclador um programa de PCR com uma etapa de desnaturação inicial de 5 min a 94°C, sucedendo-se 30 ciclos compostos por desnaturação a 94°C durante 1 min, emparelhamento a 50°C durante 1 min e extensão a 72°C durante 3 min. Terminou-se com uma etapa de extensão final a 72°C durante 10 min. O produto do PCR foi analisado em gel de agarose (consultar II.2.5).

Tabela II.1. Sequências de primers delineados para amplificação do fragmento 1 correspondente ao gene *AGAP009098* por PCR.

Primer	Sequência (5' – 3')	Tamanho (pb)	T _M (°C)	Coordenadas
<i>Forward1</i>	aaGCTAGCATGGAAGTGAATAACTCAG	27	59	44 – 62
<i>Reverse1</i>	ttGAATTCTTAATCAAGATAAACTGGATCCTC	32	58	721 – 741

Assinalado a cinzento na sequência os locais de corte das enzimas de restrição.

II.2.5 - Análise dos produtos amplificados por electroforese em gel de agarose

Separaram-se os produtos de PCR (5 µl de cada amostra) por electroforese em gel de agarose (1% (p/v)), em tampão TBE 1x (Tris 89mM, ácido bórico 89mM, 2mM EDTA, pH 8.0.) e brometo de etídeo (10 mg/ml), aplicando-se uma voltagem de 120V, durante 50 min, posteriormente realizou-se a observação e foto-documentação do gel, no sistema UVIDOC. Os tamanhos dos fragmentos foram analisados por comparação com o padrão de migração do marcador de massa molecular Hyperladder II.

II.2.6 - Indução da expressão de células de *E. coli* BL21 (DE3) PlyS

A indução da expressão de proteínas recombinante foi realizada com IPTG devido às características das bactérias competentes utilizadas (consultar II.1.2).

As colónias de *E. coli* BL21 (DE3) PlyS recombinantes cresceram em 10 ml de meio LB líquido suplementado com canamicina, a 37°C, ON com agitação, na

incubadora de agitação. Após esse período, retirou-se em duplicado amostras destas culturas, as quais foram inoculadas meio LB líquido novo, também suplementado com canamicina, e colocados a 37°C com agitação, durante o tempo necessário até que a densidade óptica atingisse valores de absorvância entre 0,6 e 0,8. Recolheram-se alíquotas (1 ml) correspondentes à cultura não induzida e procedeu-se à indução da expressão dos clones recombinantes com IPTG (1 mM) a duas temperaturas diferentes. Assim incubou-se um dos duplicados das amostras a 37°C e o outro à temperatura ambiente (28°C), ambos com agitação. Foram recolhidas alíquotas às 3h, 5h e ON após a indução (figura II.1). Os clones bacterianos recombinantes (submetidos ou não a indução com IPTG) foram recolhidos por centrifugação a 3225 x g durante 20 min.



Figura II.1: Desenho experimental para a avaliação das condições ótimas para o crescimento das bactérias recombinantes.

Os sedimentos bacterianos (pellet) foram mantidos a -20°C até ao seu processamento, que consistiu numa ressuspensão num volume adequado de tampão Laemmli 1x de aplicação em SDS-PAGE (0,2M Tris-HCl, SDS 10% (p/v), glicerol 50%, azul de bromofenol, β -mercaptoetanol 3% (v/v); 10 μ l por cada 0.1 unidade de absorvância), para a obtenção de um extracto total, ou em 100 μ l de PBS para a obtenção do extracto solúvel/insolúvel, seguiram-se 3 ciclos de congelação/descongelação e sonicação durante 5 seg, com intensidade média (50%). Neste último caso, efectuou-se mais um passo de precipitação por centrifugação a 20800 x g, durante 30 seg, tendo sido analisado por SDS-PAGE (dodecil sulfato de sódio – electroforese em gel de poliacrilamida; consultar II.2.14), tanto o sobrenadante, como o precipitado.

II.2.7 - Purificação da proteína AgTGM98_1 em condições nativas

A purificação de proteínas marcadas, sob condições nativas pode ser utilizada para purificar proteínas associadas, tais como, subunidades de enzimas e proteínas de ligação presentes nas células que as sobre expressam. A cauda de histidinas serve como âncora permitindo separar e purificar a proteína pretendida a partir do lisado celular. As caudas de histidina ligam-se com muita afinidade à resina Ni-NTA (ácido triacético nitrilo) e a ligação não específica à resina pode ser reduzida, incluindo uma baixa concentração de imidazole (10-20 mM) nos tampões de lise e lavagem (QIAexpressionist, 2003). Desta forma, a purificação das proteínas 6xHis-tagged de *E. coli* sob condições nativas foi realizada por cromatografia de afinidade com uma resina quelante com níquel.

Para a remoção da solução de conservação da resina de Ni-NTA 50% efetuou-se uma centrifugação a 3225 x g durante 6 min. Seguidamente, lavou-se a resina de Ni-NTA duas vezes, com PBS num volume correspondente a 3 vezes o volume de resina, por centrifugação a 3225 x g durante 6 min.

Adicionou-se 1 ml de resina Ni-NTA a 4 ml de lisado de bactérias e misturou-se num agitador rotativo a 4°C, durante 1h. Seguidamente centrifugou-se a 3225 x g durante 6 min. Os sobrenadantes foram guardados para análise posterior através de SDS-PAGE. Lavou-se duas vezes com 4 ml de tampão de lavagem (50mM NaH₂PO₄•H₂O, 300mM NaCl, 20mM imidazole, pH 8.0). Seguindo-se uma centrifugação a 3225 x g durante 6 min. Foi recolhido sobrenadante para análise em SDS-PAGE nas duas etapas. Por fim, eluiu-se 4 vezes a proteína em 500 µl de tampão de eluição (50mM NaH₂PO₄•H₂O, 300mM NaCl, 250mM imidazole, pH 8.0). A quantificação proteica final foi avaliada num espectrofotómetro NanoDrop™ 1000 (assumindo-se que por cada unidade de absorvância a 280nm correspondem 1 mg/ml).

II.2.8 - Produção de anticorpos policlonais

Foi produzido um soro policlonal de murganho contra AgTGM98-1. Os murganhos fêmea CD1 foram injetados intraperitonealmente (ip) com 10-90 µg de AgTGM98-1 purificado emulsionado numa parte igual de adjuvante completo de Freund, na primeira inoculação e adjuvante incompleto de Freund, nas seguintes

inoculações. Foram inoculados quatro a cinco vezes com intervalos de duas semanas, o aumento do título de anticorpos foi monitorizado por ELISA (ensaio enzimático de ligação de anticorpos). O anticorpo policlonal contra AgTGM100, denominado ARM-AGAP009100, foi produzido em coelhos contra um epítopo peptídico específico (CQANSYFSRYYLNEEFNEV) por um fornecedor especializado (GL Biochem, Shanghai, China).

II.2.9 - ELISA

O método ELISA foi desenvolvido por Peter Perlmann e Engvall Eva (1971), cujo princípio básico é a utilização de uma enzima para detectar a ligação de um antígeno (Ag) ou de um anticorpo (Ab). A enzima converte um substrato incolor (cromogénico) num produto corado, indicando a presença de Ag:Ab. Existem três tipos de ELISA: ELISA competitivo, ELISA Sandwich (figura II.2a) e ELISA indirecto (figura II.2b) (Wenk & Fernandis, 2007).

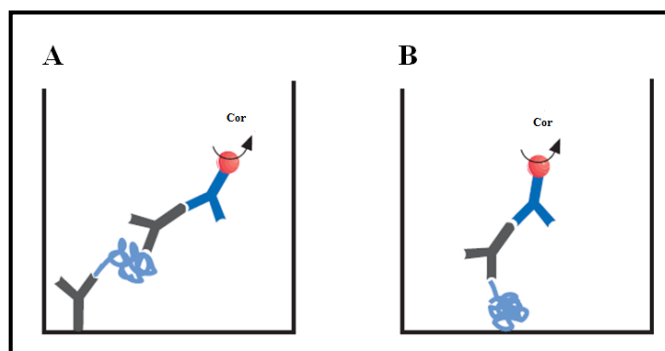


Figura II.2. Esquema ilustrativo do funcionamento dos métodos de (A) ELISA sandwich e (b) ELISA indirecto.

No presente trabalho utilizou-se um ELISA indirecto, onde a placa de microtitulação é revestida com Ag, com a junção de Ab primário, este liga-se ao Ag. O Ab secundário marcado com uma enzima é então adicionado e ligar-se-á ao Ab primário, emitindo sinal após contacto com o substrato específico (figura II.2b). Desta forma, em todos os poços a analisar colocou-se 100 µl da proteína AgTGM98-1 purificada diluída em tampão carbonato 50mM (14mM Na₂CO₃, 36mM NaHCO₃, pH 9.0) e incubou-se durante a noite a 4°C. Como controlo, foram incluídos poços em que o antígeno foi substituído por tampão carbonato. Lavou-se com PBS-T (PBS, Tween 0.05% (v/v)) três vezes e colocou-se em cada poço 200 µl de gelatina (15% (p/v)). Incubou-se 1h a 37°C.

Repetiu-se a lavagem com PBS-T e em seguida adicionou-se 100 µl de cada um dos soros de murganho a testar. Incubou-se 1h a 37°C. Foi novamente repetida a lavagem da placa com PBS-T, adicionando-se de seguida 100 µl de soro anti-IgG de murganho conjugado com fosfatase alcalina, na diluição de 1:10000. Incubou-se 1h a 37°C. A placa foi lavada com PBS-T e por fim adicionou-se a todos os poços 100 µl de substrato de enzima BCIP (5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato pH 8.5-9.6; 1mg/ml) em PBS. Incubou-se 30 minutos a 37°C. Efectuou-se a leitura da absorvância a 405 nm num fluorímetro. Todos os soros foram testados em duplicado.

II.2.10 - Extração de proteínas

Foram extraídas proteínas de corpo inteiro, estádios larvares, intestino médio, glândulas salivares e corpo gordo de mosquitos, em tampão de extração de proteínas RIPA (Tween 20 (v/v), 50mM Tris, pH 7,4, 150mM NaCl, 1mM EDTA) com inibidores de proteases, por homogeneização mecânica. O homogenado foi centrifugado a 20800 x g, a 4°C durante 5 min sendo recolhido o sobrenadante. Para utilização em ensaios enzimáticos é conservado em gelo até utilização (consultar II.2.12 e II.2.13), para análise por eletroforese seguiu-se o procedimento descrito em II.2.11. Para extração de proteínas do intestino médio, submeteu-se a amostra a sonicação a frio, em potência média por três vezes durante 5 seg, tendo esta sido posteriormente centrifugada durante 5 min a 20800 x g e o sobrenadante analisado de acordo com o descrito em II.2.11. Para a extração de proteínas das glândulas salivares sonicou-se a potencia média durante 10 seg, seguiram-se três ciclos de congelação/descongelação, após esta fase centrifugou-se a 20800 x g durante 1 min a 4°C. Ao sobrenadante adicionaram-se cinco volumes de acetona gelada e incubou-se a -20°C durante 1h30min. Centrifugou-se a 4°C durante 30 min a 10640 x g, descartando o sobrenadante. Após secar o pellet ao ar, este foi ressuscitado em 100 µl de PBS e seguiu-se o procedimento descrito em II.2.11.

II.2.11 - Preparação das extrações proteicas para eletroforese

Todas as proteínas extraídas, foram submetidas a análise por electroforese. Após a extração de proteínas juntou-se tampão de aplicação de SDS-PAGE, aqueceram-se todas as amostras a 100°C durante 5 min num termobloco. As amostras foram

posteriormente aplicadas num gel de SDS-PAGE (consultar II.2.14).

II.2.12 - Quantificação proteica

Para a quantificação proteica das proteínas extraídas, foi utilizado o kit Pierce BCA Protein Assay, por ser uma formulação compatível com detergente, com base de ácido bicinonínico (BCA) para a detecção colorimétrica e quantificação de proteína total. Este método combina a redução de Cu^{2+} em Cu^{+} pelas proteínas, em meio alcalino (reação de biureto), com a detecção colorimétrica altamente sensível e selectiva do catião cuproso (Cu^{+}) utilizando um reagente contendo ácido bicinonínico (Thermo scientific, 2011). Foram seguidas as instruções do fabricante para a preparação do “BCA working reagent” e para o procedimento em microplaca. A absorvância foi lida a 590 nm.

II.2.13 - Análise de proteínas por SDS-PAGE

A expressão dos fragmentos proteicos foi analisada através de electroforese em gel de poliacrilamida em condições desnaturantes, pela acção de SDS, adquirindo as proteínas todas a mesma carga e sendo separadas num campo eléctrico constante consoante a sua massa molecular. Foram utilizados géis com concentrações de poliacrilamida de 12,5% (consultar anexo 1, tabela A1.4) e um tampão de electroforese específico 1x (250mM Tris, 860mM glicina, SDS 1%).

As amostras aplicadas em SDS-PAGE foram submetidas a uma voltagem constante de 150V, durante 50 min. Como padrão utilizou-se um marcador de peso molecular. Após a electroforese, os géis foram corados com uma solução azul de comassie (Coomassie 0,25% (p/v), metanol 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)) e posteriormente descorados (MeOH 50% (v/v), ácido acético 10% (v/v)) ficando apenas visível os locais onde existem proteínas. Analisou-se o tamanho dos fragmentos proteicos por comparação da sua mobilidade electroforética com a do marcador de massa molecular.

II.2.14 - Western blotting

O Western blotting envolve a transferência electroforética de proteínas previamente separadas para uma membrana, seguida de imunodeteção dessas mesmas proteínas. Neste trabalho utilizaram-se membranas de PVDF (difluoreto de polivinilideno), num sistema Mini Trans-Blot® Electrophoretic. Foi desta forma utilizado, um tampão de transferência (0,479 M Tris, 0,17M glicina, SDS 10% (p/v)) sendo as membranas submetidas a uma corrente constante de 400mA durante 1-2h.

Após a transferência, as membranas foram bloqueadas com leite em pó magro a 3% (p/v) em TBS 1x (10 mM Tris, 0,15 M NaCl, pH 7,6) e incubada com anticorpos anti-His-tag diluição 1:2000, anti-AgTGM98-1 diluição 1:1500, anti-AgTGM100 diluição 1:1000 e anti- β -actina (C4) diluição 1:1000 e, em seguida, com o anticorpo secundário (conjugado peroxidase de rábano (HRP)), anticorpo anti-IgG de murganho HRP-ECL™ ou com anticorpo anti-IgG de coelho HRP-ECL™ ambos com diluição 1:25000, seguido pelo desenvolvimento com o kit Amersham™ ECL™ Prime. As diluições dos vários anticorpos foram preparadas em TBS-T 0,05% (v/v) e leite em pó magro 0,5% (p/v).

II.2.15 - Ensaio de atividade da TGM

Atividade da TGM foi medida pelo método do hidroxamato adaptado de Folk & Cole (1966). A mistura reacional final continha 30 μ l de extracto de proteína total (concentração variável; consultar II.2.12) à qual foi adicionada a 200 μ l de cocktail de reação contendo 200mM de tampão Tris, pH 6,0, 5mM de CaCl_2 , 100mM / 10mM de hidroxilamina / glutationa e 0,356mM CBZ - Glutaminylglycine (CBZ-Gln-Gly). Após incubação a 37°C durante 10 min, foram adicionados aos 230 μ l da solução de enzima / substrato, 500 μ L de ácido tricloroacético 12% (p/v) e 500 μ L de FeCl_3 5% (p/v) em 100mM de HCl sendo posteriormente submetido a centrifugação 10000 g durante 10 min, a cor resultante foi medida a 525nm num espectrofotómetro. Foi utilizado como controlo positivo TGM de fígado de porquinho-da-índia. Como padrão de calibração utilizou-se ácido L-glutâmico- γ -monohidroxamato. Uma unidade de atividade de TGM foi definida como a quantidade de enzima necessária para produzir 1 μ mole de hidroxamato por min. A atividade específica foi expressa em unidades de atividade de

TGM / (mg de proteína).

II.2.16 - Fixação de material biológico

Foi estabelecida uma linha temporal referente à data da refeição sanguínea e recolheram-se intestinos médios nos pontos temporais 18h, 24h e 48h. Procedeu-se à fixação numa solução de paraformaldeído (4% (p/v) paraformaldeído, 1M NaOH) em PBS 1x (PFA 4%). Os intestinos médios foram dissecados e de imediato colocados na solução PFA 4% e mantidos a 4°C durante 24h com agitação constante. Foi mantido um rácio de 1 volume de tecido para 10 volumes de fixador. Após a incubação a 4°C realizou-se uma centrifugação a 68 x g durante 5 min para a remoção do fixador. Foi lavado com PBS 1x, pH 7.2 várias vezes durante mais de 4h, seguindo-se uma desidratação com MeOH 100%. Todas as amostras foram mantidas a -20°C até posterior processamento.

II.2.17 - Hidratação do material biológico “whole mount” e de corte histológico

O material fixado pelo método apresentado em 2.2.16 foi re-hidratado antes do processamento. Para o procedimento em “whole mount” as amostras foram, submetidas a duas incubações com MeOH 70% (v/v) em PBS-Tr 1x (PBS, 0,3% (v/v) Triton X-100) durante 10 min, a temperatura ambiente e agitação. Seguida de uma incubação com MeOH a 50% (v/v) em PBS 1x durante 10 min a temperatura ambiente e agitação. Finalizando com uma lavagem em PBS 1x, pH 7.2 durante 15 min a temperatura ambiente e com agitação.

Para o procedimento em lâmina, os cortes foram submetidos a sucessivas incubações a temperatura ambiente, com agitação manual ocasional. Foram realizadas duas incubações com xilol durante 10 min cada, uma incubação com MeOH a 100% durante 10 min, uma incubação com MeOH a 96% (v/v) durante 10 min, uma incubação com MeOH a 70% (v/v) durante 10 min e várias lavagens em água destilada (sempre nova) com a duração de 2 min.

II.2.18 - Bloqueio do material biológico “whole mount” e em corte histológico

O bloqueio do material biológico é realizado com uma proteína, como a gelatina, leite magro, e albumina de soro bovina (BSA), que satura o tecido com proteína, de forma a ocupar os possíveis locais de ligação inespecífica do anticorpo primário. Para o procedimento em “whole mount”, os intestinos médios foram incubados em 250 µl de solução de bloqueio (3% (p/v) BSA, 9 ml solução de anticorpo, 1 ml água MilliQ®), durante 1h com agitação a temperatura ambiente. Seguiu-se uma centrifugação a 958 x g durante 2 min e a remoção da solução de Bloqueio. Lavou-se três vezes com PBS-Tr 1x durante 15 min com agitação, a temperatura ambiente.

Para o procedimento em lâmina, os intestinos médios foram lavados duas vezes durante 3 min sem agitação, a temperatura ambiente e de seguida incubados em solução de Bloqueio, durante 2h sem agitação a 4°C.

II.2.19 - Detecção por imunohistoquímica “whole mount”

A técnica de imunohistoquímica é usada para detectar componentes em tecidos, utilizando um anticorpo específico com um marcador visível que irá ligar-se ao antígeno no interior do tecido. Os tecidos são parafinizados, congelados ou incluídos em resina (Wenk & Fernandis, 2007). Após a re-hidratação (consultar II.2.17) e o bloqueio (consultar II.2.18) das amostras, adicionou-se 50 µl de anticorpo primário a uma solução de diluição (PBS 1x, 0,5% (v/v) Triton X-100, 1mM EDTA pH 8.0, 0,1% (p/v), 0,1% (p/v) BSA). As diluições dos anticorpos primários foram de 1:500 para anti-AgTGM98-1, anti-AgTGM100 e anti-β-actina (C4). Os intestinos médios foram incubados por 30 min à temperatura ambiente com agitação com os anticorpos AgTGM98-1 e anti-AgTGM100 e em seguida colocados a 4°C sem agitação numa incubação ON; a incubação com o anticorpo anti-β-actina (C4) durou 1h à temperatura ambiente, com agitação. Para se verificar a especificidade do anticorpo anti-AgTGM98 realizou-se um teste de reabsorção, em que o anticorpo primário (anti-AgTGM98-1 diluição 1:500) foi incubado ON, a 4°C com a proteína recombinante AgTGM98-1 (diluição 1:500 da solução stock), para a absorção dos anticorpos específicos. Centrifugou-se a 426 x g durante 2 min e removeu-se a solução de anticorpo. Lavou-se

três vezes com PBS-Tr 1x durante 15 min com agitação, a temperatura ambiente. Adicionou-se 50 µl de anticorpo secundário anti-IgG de murganho ou anti-IgG de coelho conjugado com avidina-HRP, diluição 1:200 em solução de anticorpo e agitou-se durante 1h a temperatura ambiente. Repetiu-se a centrifugação e a lavagem. Adicionou-se 50 µl de anticorpo conjugado com avidina-HRP, diluição 1:400 em PBS 1x e agitou-se durante 1h a temperatura ambiente. Repetiu-se a centrifugação e a lavagem. Adicionou-se a solução de substrato DAB (3,3'-diaminobenzidina) peroxidase (0,05% (p/v) DAB, 0,015% (v/v) H₂O₂, PBS pH7.2) e incubou-se durante 15 min a temperatura ambiente sem agitação (figura II.3). Após a revelação colorimétrica lavou-se 3 vezes em PBS-Tr 1x durante dois min e novamente três vezes durante 15 min com agitação, a temperatura ambiente.

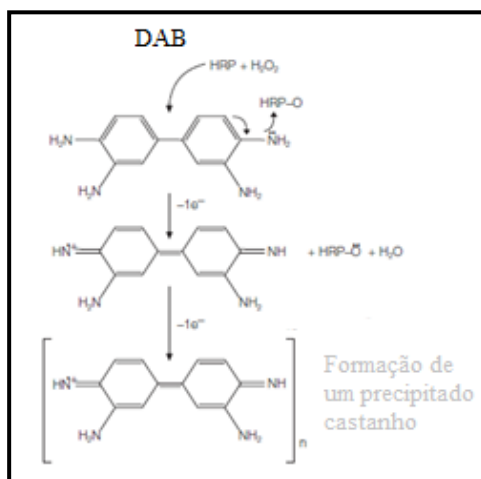


Figura II.3. Substrato cromogénico para HRP utilizado neste método. Adaptado de Protein Blotting guide, bio-rad.

II.2.20 - Cortes histológicos de material biológico

O tecido foi desidratado (consultar II.2.16), submetido a duas incubações de 1h em xilol a temperatura ambiente, e embebido em parafina ON à temperaturas de 58°C-59°C. A inclusão em parafina foi feita manualmente. Um “bloco” de parafina foi preparado incluindo o material experimental e armazenado a 4°C até se proceder à preparação dos cortes histológicos. Os cortes de 7 µm foram realizados num micrómetro Leica. Os cortes foram montados em lâminas previamente revestidas com poli-L-lisina.

II.2.21 - Detecção por imunohistoquímica de cortes histológicos

A rehidratação (consultar II.2.17) e o bloqueio (consultar II.2.18) foram realizado sobre a lâmina com os cortes de material biológico (consultar II.2.20). Adicionou-se o anticorpo primário diluído em solução de anticorpo. Os anticorpos primários foram diluídos 1:500. As incubações com os anticorpos foram ON, a 4°C. Lavou-se duas vezes com PBS-Tr 1x durante 3 min, à temperatura ambiente. Adicionou-se o anticorpo secundário anti-IgG de murganho ou anti-IgG de coelho conjugado com avidina-HRP, diluído 1:200 em solução de diluição e incubou-se durante 50 min à temperatura ambiente. Lavou-se duas vezes com PBS-Tr 1x durante 3 min, a temperatura ambiente. Adicionou-se o anticorpo conjugado com avidina-HRP, diluição 1:400 em PBS e incubou-se durante 50 min a temperatura ambiente. Lavou-se duas vezes com PBS-Tr 1x durante 3 min, a temperatura ambiente. Adicionou-se a solução de DAB, o substrato da peroxidase e incubou-se durante 15 min à temperatura ambiente, sem agitação. Após o desenvolvimento colorimétrico, lavou-se 3 vezes em PBS-Tr 1x durante 2 min, à temperatura ambiente.

II.2.22 - Montagem definitivas do material biológico em “whole mount” e em corte histológico

Após a realização do método descrito em II.2.19, as amostras “whole mount” foram colocadas numa lâmina, numa gota de glicerol 32%, colocou-se a lamela e esmagou-se, fazendo uma ligeira pressão sobre o material (denominado, daqui em diante, de “crushed”). Estas preparações foram guardadas a 4°C. Após a realização do método descrito em II.2.21, as amostras em corte histológicos foram montadas em DPX (1,3-Dietil-8-fenilxantina).

II.2.23 – Análise estatística

A atividade da TGM foi analisada pelo método estatístico ANOVA. Foi aplicada a correção de Bonferroni para múltiplas comparações de modo a avaliar a diferença entre as médias das atividade.

III - Resultados

III.1 - Transformação das células BL21(DE3) pLys S com plasmídeo pET-28

Foram transformados 3 grupos de células *BL21(DE3)*pLysS (1) com plasmídeo pET-28 que contém a sequência de interesse (698 pb pertencente ao gene codificante para AgTGM98); (2) com plasmídeo pET-28 sem inserto (controle positivo da transformação); (3) e plasmídeo pET-28 incubado com H₂O (controle negativo da transformação). Após a sua incubação, verificou-se que não havia crescimento bacteriano no controle negativo indicando a inexistência de contaminações, verificou-se crescimento no controle positivo com bom rendimento indicando que as células estavam competentes para a recepção dos plasmídeos (figura III.1A). Nas placas correspondentes à transformação com o plasmídeo recombinante foi também possível observar crescimento bacteriano (figura III.1B).

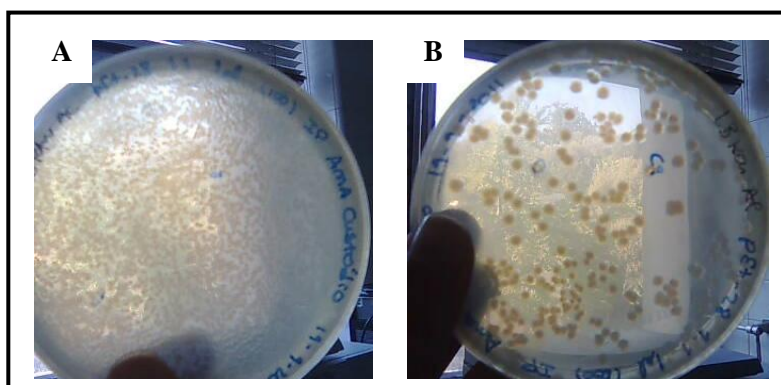


Figura III.1. Ilustração de placas de meio LB sólido suplementadas com Kan inoculadas com bactérias transformantes com (A) plasmídeo pET-28 sem inserto (controle positivo da transformação) e (B) plasmídeo pET-28 que contém a nossa sequência de interesse.

Para confirmar a presença do inserto, foram preparadas culturas das colônias transformantes. Após extração do DNA plasmídico, a análise por PCR e electroforese em gel de agarose, revelou um produto com um peso molecular aproximado de 698 pb. As colônias contendo o inserto com o tamanho esperado foram utilizadas na preparação de culturas em larga escala para purificação da proteína recombinante.

Resultados

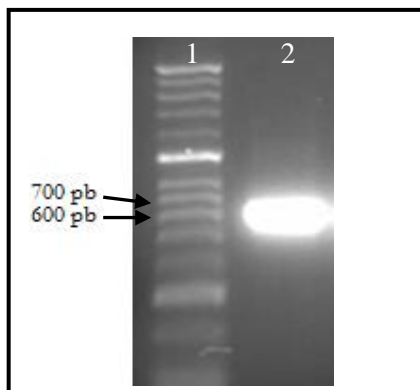


Figura III.2. Confirmação da presença do fragmento de interesse, com 698 pb pertencente a parte do gene codificante para AgTGM98. **(1)** Marcador (Hyperladder II) **(2)** DNA plasmídico de *E. coli* BL21DE23 amplificado por PCR com os primers descritos na tabela II.1.

III.2 - Produção da proteína recombinante AgTGM98-1 em larga escala

Para se averiguar quais as condições ótimas para a produção desta proteína recombinante desenhou-se um protocolo experimental (consultar II.2.6) que incluía duas temperaturas (37°C e temperatura ambiente (posteriormente avaliada nos 28°C)) e 3 grupos de bactérias em crescimento, num dos grupos seria induzido a expressão da proteína recombinante, no outro grupo essa expressão não seria induzida, que funciona como controlo à indução. Existiu ainda um grupo controlo, correspondente a bactérias não transformadas, como controlo negativo.

Permitiu-se que as bactérias se desenvolvessem até que a densidade óptica da cultura apresentasse valores de absorvância entre 0,6 e 0,8 a 600 nm. Assim que este requisito foi atingido, induziu-se a expressão da proteína recombinante através da adição de IPTG. Foram retiradas alíquotas para análise por SDS-PAGE às 3h, 5h e ON após indução, tanto no grupo de temperatura ambiente (28°C) como no grupo dos 37°C.

Verificou-se que a produção de proteína recombinante, com peso molecular esperado de 25.9 kDa, se dava às 3h e 5h após indução a 28°C (figura III.3A) e também às 3 h a 37°C (figura III.3B), no entanto, as condições que mostram uma produção em maior quantidade encontram-se a temperatura ambiente (28°C), às 3h após a indução (Figura III.3A rectângulo branco). O rácio de mobilidade eletroforética confirma a posição da proteína recombinante no peso molecular esperado, sendo esta de aproximadamente 26 kDa (consultar anexo 4).

Resultados

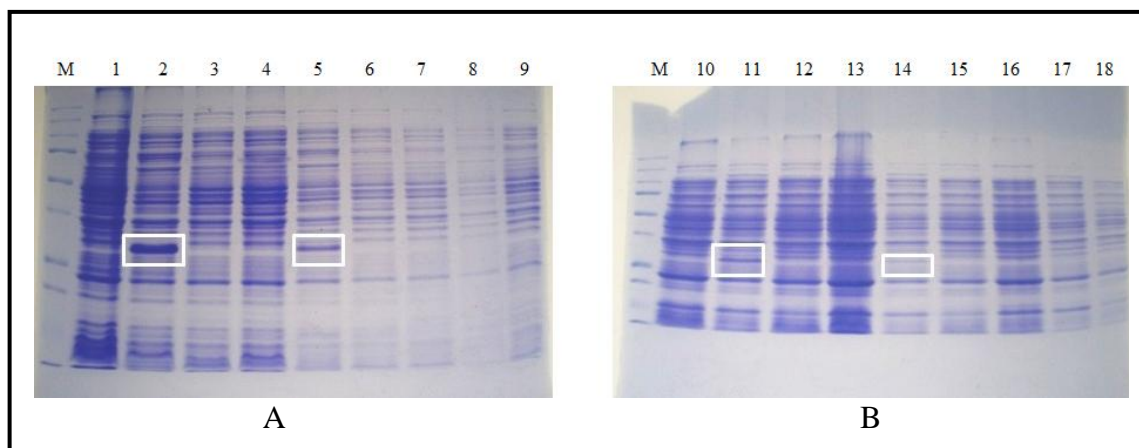


Figura III.3. Géis SDS-PAGE com extratos de proteínas de *E. coli* BL21DE23 transformantes às 3 h, 5 h e ON de forma a determinar as condições ótimas para a produção da proteína recombinante, (A) 28°C; 1 - controlo 3h; 2 - induzido (I) 3h; 3 - não induzido (NI) 3h; 4 - controlo 5h; 5 - I 5h; 6 - NI 5h; 7 - controlo ON; 8 - I 5h; 9 - NI 5h; (B) 37°C; 10 - controlo 3h; 11 - I 3h; 12 - NI 3h; 13 - controlo 5h; 14 - I 5h; 15 - NI 5h; 16 - controlo ON; 17 - I 5h; 18 - NI 5h; retângulo branco - proteína recombinante com peso molecular esperado de 25.9 kDa.

Foi também observado a localização sub-cellular ou intra-celular da proteína recombinante na bactéria, foi deste modo realizado um SDS-PAGE dos extractos de proteína da fracção solúvel ou insolúvel dos lisados bacterianos (consultar II.2.7). Como se pode observar na figura III.5, a proteína encontra-se presente na fracção solúvel (retângulo vermelho) apesar de haver uma perda para a fracção insolúvel (retângulo branco) (Figura III.4).

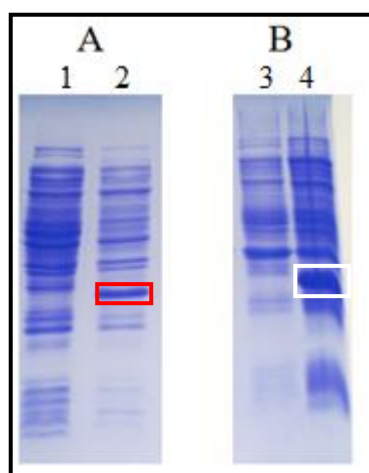


Figura III.4. Géis SDS-PAGE com extratos de proteínas de *E. coli* BL21DE23 transformantes às 3 horas, a 28°C, (A) extracto solúvel; 1 - NI; 2 - I; e (B) extracto insolúvel 3 - NI; 4 - I.

III.3 - Purificação da proteína recombinante AgTGM98-1

A purificação da proteína recombinante AgTGM98-1 foi realizada de acordo como o descrito em II.2.7. Em todos os passos foram retiradas alíquotas para se verificar se havia perda de proteína recombinante. O protocolo conseguiu purificar com sucesso proteínas com cauda de histidina (figura III.5). A quantificação final da proteína recombinante foi determinada em 1,73 mg/ml.

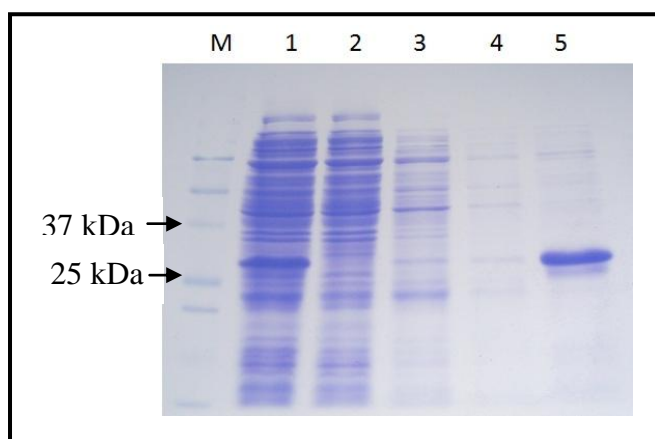


Figura III.5. Gel SDS-PAGE com extratos de proteínas de todos os passos da purificação da proteína recombinante através de IMAC (“Immobilized metal ion affinity chromatography”) com Ni-NTA. (1) extrato bruto após lisado, (2) 1ª centrifugação, (3) 1ª lavagem, (4) 2ª lavagem e (5) eluído final. Proteína recombinante com peso molecular esperado de 25.9 kDa.

III.4 - Produção de soro policlonal contra proteína recombinante AgTGM98-1

Foi produzido um soro policlonal de murgancho contra AgTGM98-1 através da injeção intraperitonal de murgancho fêmea CD1, após várias inoculações estabeleceu-se por ELISA (consultar II.2.8) o título indicativo do anticorpo policlonal produzido. Dos 4 murgancho inoculados obteve-se os títulos de 1:400 em 3 destes, e 1:200 num dos murgancho. Este soro foi posteriormente utilizado na imunodeteção das transglutaminases de mosquito.

III.5 - Determinação da atividade enzimática da AgTGM

A atividade enzimática de transamidase das TGM dos mosquitos adultos *A. gambiae* e nos respectivos estadios larvares foi quantificada de acordo com o método do hidroxamato adaptado de Folk & Cole (1966) (consultar II.2.13). Pode-se verificar pelo gráfico III.1 que apesar de não haver diferenças estatisticamente significativas (anexo 4) na quantificação de U/mg, se pode observar que a atividade nos machos é superior à das fêmeas, pupas e estados larvares de L1 a L4 (anexo 2).

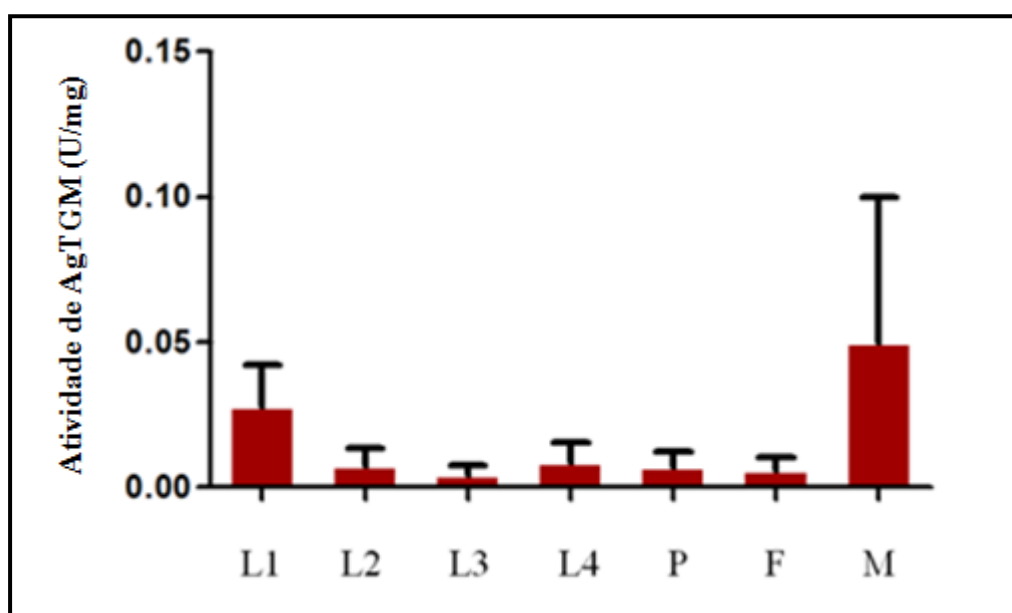


Gráfico III.1. Atividade TGM em cada estadio de desenvolvimento de *A. gambiae*. Realizado pelo método colorimétrico por hidroxamato (Folk & Cole, 1966). P- pupa; F- fêmea, M- macho. Médias \pm d.p de três experiencias independentes.

III.6 - Caracterização da AgTGM98

A caracterização da proteína AgTGM98 foi realizada por western blotting (consultar II.2.14) com os anticorpos produzidos apresentados no ponto II.2.8.

O anticorpo β -actina foi utilizado como controlo em gel de acrilamida, tornando desta forma possível a comparação entre o sinal obtido pela detecção das proteínas em estudo, nomeadamente a AgTGM98 e a AgTGM100. O padrão de detecção da β -actina C4 em estratos brutos de mosquito está representado na figura III.6. De notar que são visíveis duas bandas aquando da detecção da actina, correspondendo a de menor peso

Resultados

molecular à forma nativa desta proteína e de maior peso molecular a uma isoforma. Desta forma, sabendo que não coincide com os tamanhos moleculares das proteínas em estudo, as incubações e detecções do controlo e das TGMs foram realizadas em simultâneo nas respectivas membranas.

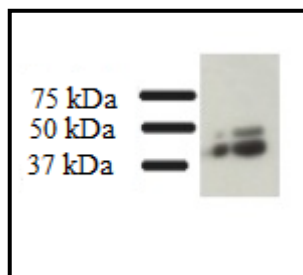


Figura III.6. Padrão de detecção por western blot da β -actina C4 (controlo) em estratos brutos de mosquito fêmea.

Para se ter a confirmação de que as proteínas purificadas observadas no eluído final, apresentado na figura III.5, correspondiam à proteína recombinante AgTGM98-1, realizou-se um western blotting com um anticorpo anti-His-tag com a diluição de 1:2000 e 1:25000 de anticorpo secundário anti-IgG de murganho ECL-HRP. Como se pode observar na figura III.7, as proteínas purificadas apresentam uma ligação a uma cauda de 6 histidinas (seta preta).

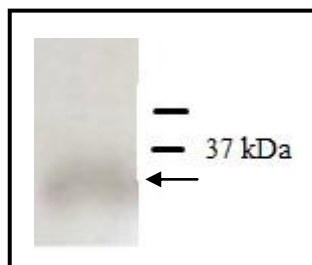


Figura III.7. Western blot com um anticorpo anti-His-tag detectando o eluído final da proteína recombinante AgTGM98-1 (seta preta).

Para a caracterização de AgTGM98, os títulos de anticorpos utilizados foram de 1:1500 do anticorpo anti-TGM98 e 1:25000 do anticorpo secundário anti-murganho ECL-HRP peroxidase. Como se pode observar, foi obtido em fêmeas adultas alimentadas com glucose a detecção de duas bandas, a banda superior com o peso esperado de 86,5 kDa e uma dupla banda de peso molecular inferior, tendo

Resultados

aproximadamente 50 - 60 kDa (figura III.8).

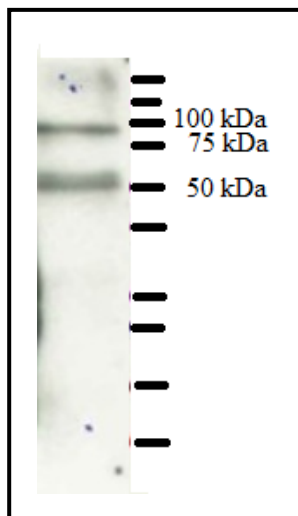


Figura III.8. Padrão de detecção por western blotting da AgTGM98 em estratos brutos de mosquito fêmea.

Foram caracterizados os padrões de detecção para os estádios larvares L2, L4 e em pupas. Foram também caracterizados os padrões de detecção da AgTGM98 durante a infecção por *P. berghei*. Foram recolhidos mosquitos às 24h, 8º (D8) e 18º (D18) dia pós-infecção por *P. berghei*. Nos dois primeiros pontos temporais foram analisados mosquitos inteiros, corpo gordo e intestino médio; no D18 analisaram-se apenas glândulas salivares. Como controlo às alterações introduzidas pela refeição sanguínea, foi constituído um grupo de mosquitos alimentados em sangue não infectado.

A figura III.9 mostra o padrão de detecção nos estádios larvares L2, L4 e pupas da proteína AgTGM98. Observam-se duas bandas de pouca intensidade com cerca de 80 – 100 kDa (rectângulo branco) e uma banda com cerca de 40 – 50 kDa. No entanto, esta figura têm um “background” acentuado e o método para a sua detecção ainda necessita de ajustes, pode também observar-se que não foi realizado neste ensaio o controlo.

Na detecção da AgTGM98 às 24h pós-alimentação (figura III.10), observa-se tanto para mosquitos alimentados com sangue infectado, como para mosquitos alimentados com sangue não infectado, em corpo gordo e em adultos, duas bandas, sendo que a banda superior apresenta 86,5 kDa e a inferior cerca de 75 kDa, visualiza-se também, nos intestinos médios, uma banda ténue de 86,5 kDa correspondente à

Resultados

AgTGM98 em ambas as alimentações, observa-se ainda, nos intestinos médios, bandas de alto peso molecular (superior a 250 kDa). Não foi realizado controlo neste ensaio, motivo pelo qual não se apresenta a imagem.

Observando as deteções da AgTGM98 nos pontos temporais D8 (figura III.11) e D18 (figura III.12) é possível verificar que apenas se observa uma banda de 86,5 kDa correspondente à AgTGM98 nos mosquitos alimentados com sangue não infectado. Nos poços correspondentes aos mosquitos infectados apenas é visível a banda correspondente à actina. Não foi possível detectar qualquer proteína nos poços correspondentes ao intestino médio, motivo pelo qual não se apresenta a imagem.

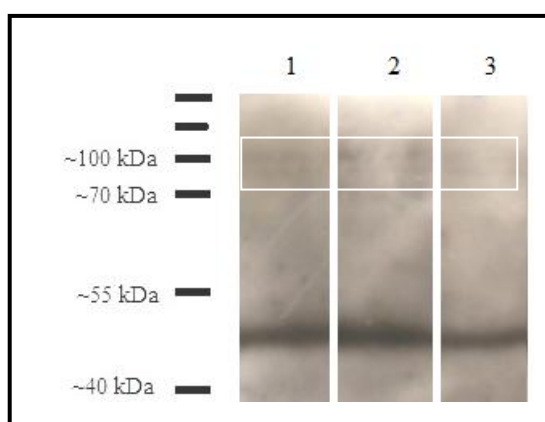


Figura III.9. Deteção da AgTGM98 em larvas e pupas de *A. gambiae* por western blotting. 1- L2; 2- L4; 3 – pupas.

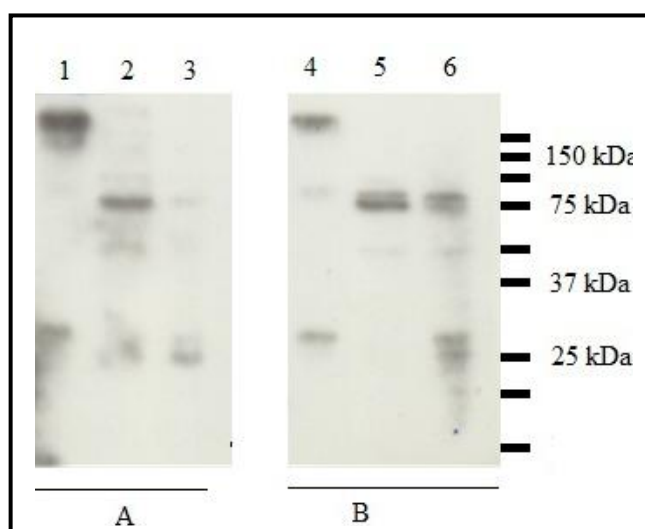


Figura III.10. Deteção da AgTGM98 em mosquitos *A. gambiae* por western blotting. (A) 24h pós-alimentação com sangue não-infectado. 1- Intestino médio; 2 – Corpo gordo; 3 – Mosquito inteiro. (B) 24h pós-alimentação com sangue infectado com *P. berghei*. 4 – Intestino médio; 5 - Corpo

Resultados

gordo; 6 – Mosquito fêmea.

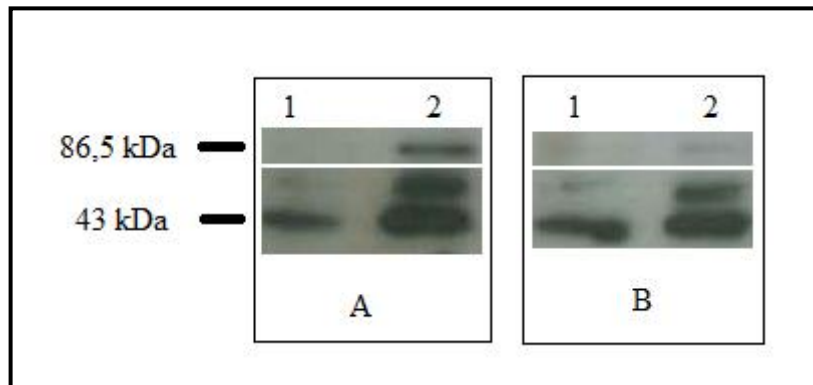


Figura III.11. Detecção da AgTGM98 em mosquitos *A. gambiae* por western blotting. **(A)** D8 pós-alimentação com sangue não-infectado. 1 - Mosquito inteiro; 2 – Corpo gordo. **(B)** D8 pós-alimentação com sangue infectado com *P. berghei*. 1 – Mosquito inteiro; 2 – Corpo gordo; M – Marcador de massa molecular. β - actina – 43 kDa.

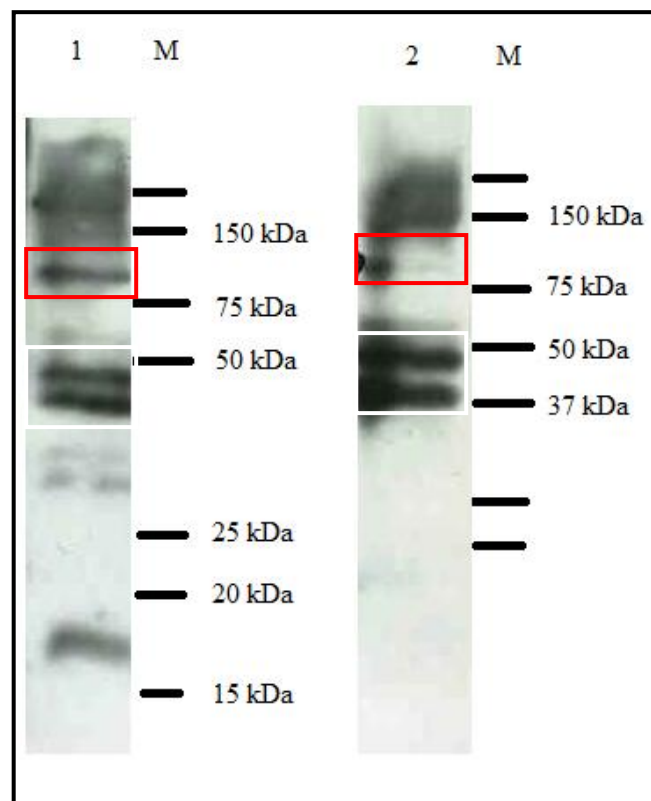


Figura III.12. Detecção da AgTGM98 em mosquitos *A. gambiae* por western blotting ao dia 18 após a refeição de sangue. 1- Glândulas salivares de mosquitos alimentados com sangue não infectado; 2 – Glândulas salivares de mosquitos alimentados com sangue infectado *P. berghei*. Retângulos brancos indicam a β - actina. M – Marcador de massa molecular.

III.7 - Caracterização da AgTGM100

A caracterização da proteína AgTGM100 foi realizada por western blotting (consultar II.2.15) com os anticorpos produzidos apresentados no ponto II.2.8. As diluições dos anticorpos utilizados foram de 1:1500 anti-AgTGM100 e 1:25000 anti-IgG de coelho ECL-HRP.

Foram caracterizados os padrões de detecção para os estádios larvares L2, L4 e em pupas. Foram também caracterizados os padrões de detecção da AgTGM100 durante a infecção por *P. berghei*. Foram recolhidos mosquitos às 24h, 8º (D8) e 18º (D24) dia pós-infecção. Nos dois primeiros pontos temporais foram analisados mosquitos inteiros, corpo gordo e intestino médio; no D18 analisaram-se apenas glândulas salivares. Como controlo às alterações introduzidas pela refeição sanguínea, foi constituído um grupo de mosquitos alimentados em sangue não infectado.

A figura III.13 mostra o padrão de detecção do estadio larvar L4 da proteína AgTGM10. Observa-se uma banda com cerca de 90 – 100 kDa, no entanto o peso molecular esperado para a proteína AgTGM100 é de 82,8 kDa. Não foi possível detectar qualquer proteína nos poços correspondentes ao estadio larvar L2 e estadio pupal, motivo pelo qual não se apresenta a imagem, e como se pode verificar não foi realizado controlo.

Na detecção da AgTGM100 às 24h pós-alimentação (figura III.14), observa-se tanto para mosquitos alimentados com sangue infectado, como para mosquitos alimentados com sangue não infectado, no corpo gordo, uma banda com cerca de 37 kDa, e uma banda com cerca de 50 kDa no intestino médio também em ambas as alimentações. Não foi realizado o controlo neste ensaio, motivo pelo qual não se apresenta a imagem.

Não foi possível detectar qualquer proteína ao D8 e D18, motivo pelo qual não se apresentam as imagens.

Resultados

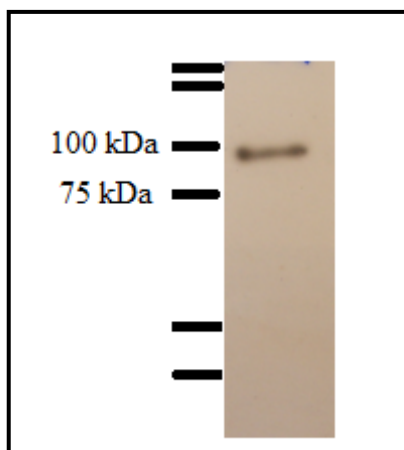


Figura III.13 Detecção da AgTGM100 em larvas L4 de *A. gambiae* por western blotting.

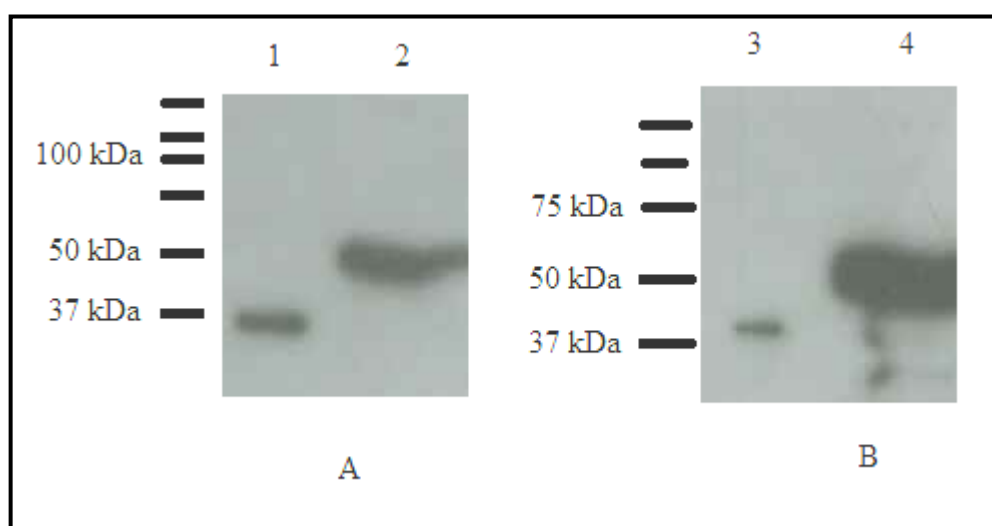


Figura III.14 Detecção da AgTGM100 em mosquitos *A. gambiae* por western blotting. (A) 24h pós-alimentação com sangue não-infectado com *P. berghei*. 1- Corpo gordo; 2- Intestino médio (B) 24h pós-alimentação com sangue infectado. 3 – Corpo gordo; 4 – Intestino médio.

III.8 - Localização da β -actina (controle)

Utilizou-se o anticorpo contra a β -actina para controlo em Western blotting, sendo também utilizada como controlo positivo para a técnica de IHC (II.2.19). Assim a localização desta proteína foi realizada com o anticorpo comercial anti- β -actina C4 com as diluições de 1:500 e 1:200 do anticorpo secundário anti-IgG de murganho conjugado com avidina-HRP. A imunolocalização revelou que esta proteína, se encontra no citoplasma das células do epitélio do intestino médio.

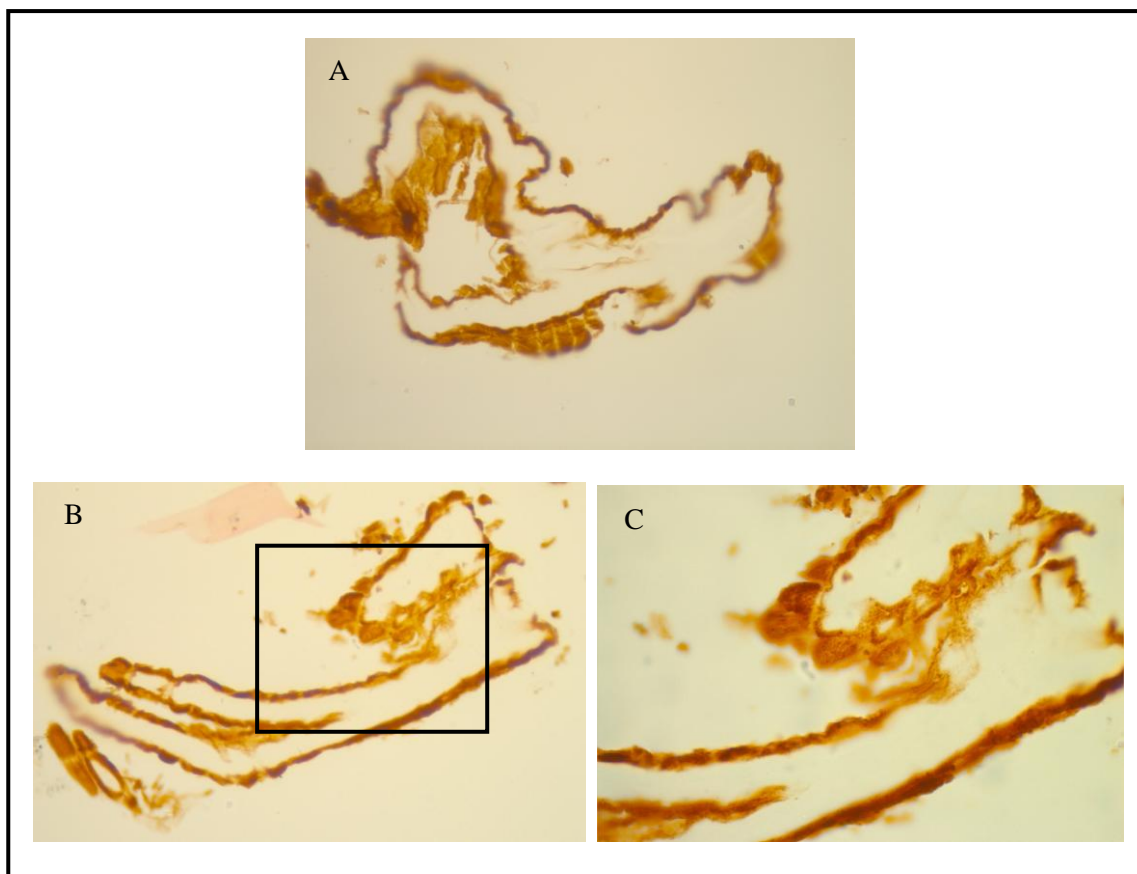


Figura III.15. Detecção da β -actina por IHC através de “whole mount” seguido de corte do intestino médio, de mosquitos alimentados com glucose, ponto temporal 18h; (A) corte 1 - observado com objectiva 40x; (B) corte 2 - observado com objectiva 40x; (C) corte 2 correspondente do quadrado preto da imagem B – observado com objectiva 100x.

III.9 - Localização da AgTGM98

Pretendeu-se analisar a localização das TGMs de *A. gambiae* às 18h, 24h, 48h, após alimentação com sangue infectado com *P. berghei*, e nos respectivos controlos, mosquitos com alimentação com sangue não infectado e mosquitos com alimentação com glucose.

A localização da proteína AgTGM98 foi realizada por IHC (II.2.19 e II.2.21) com os anticorpos produzidos referidos no ponto II.2.8. Os títulos utilizados foram de 1:500 do anticorpo anti-TGM98 e 1:200 do anticorpo secundário anti-IgG de murganho conjugado com avidina-HRP.

Resultados

A AgTGM98, em mosquitos alimentados com glucose, apresentou um comportamento membranar no lado basal do intestino médio (setas pretas). Comparando a localização da β -actina e da AgTGM98 (figuras III.15 e III.16) é possível observar que existem diferenças marcantes na forma onde se dá a detecção.

A localização da AgTGM98 foi confirmada quando se utilizou a técnica de “whole mount crushed” (figura III.17), apesar de não se ter podido ultrapassar a observado com objectiva de 40x verificou-se um padrão similar (figura III.16), indicativo de uma distribuição membranar (figura III.17, setas pretas) e a presença apenas na parte basal do epitélio. A imunolocalização mostrou que a proteína AgTGM98 está presente em todo o intestino médio, mas observa-se um maior sinal no proventrículo.

Nestes ensaios de IHC, além de caracterizar a localização das duas TGM de *A. gambiae*, pretendia-se também verificar as diferenças entre alimentações com sangue parasitado e não parasitado, no entanto, no desenvolvimento da técnica apareceram problemas, tais como os que se observam nas detecções da AgTGM98 em cortes histológicos de mosquitos alimentados com sangue (figura III.18), existe claramente uma interferência pela presença de sangue no intestino médio, caracterizada pela interferência de sinal e também por impossibilitar o corte do intestino médio e posterior fixação em lâmina, sem que o material se fragmente. Não obstante, consegue-se verificar ainda o mesmo padrão de comportamento membranar no lado basal do intestino médio (seta preta).

Um exemplo de fragmentação do material cortado está representado pela figura III.19A. No entanto, apesar de ser um exemplar de corte de intestino médio com sangue, este tem pouca quantidade e por esse motivo a sua interferência é limitada, assim pode observar-se o mesmo padrão que se observou nas outras imagens, mas com grânulos no interior, além da distinta “linha” (setas pretas) que indica uma localização membranar do lado basal do intestino médio.

Foi realizado um teste de pré-absorção com o anticorpo anti-TGM98, onde este foi pré-incubado com proteína recombinante AgTGM98, a imunolocalização resultante não apresentou sinal de detecção, permitindo verificar que o anticorpo é específico para a proteína recombinante produzida (imagem não apresentada).

Resultados

A proteína AgTGM98 apresentou-se com localização membranar, na parte basal do intestino médio e com distribuição ao longo deste.

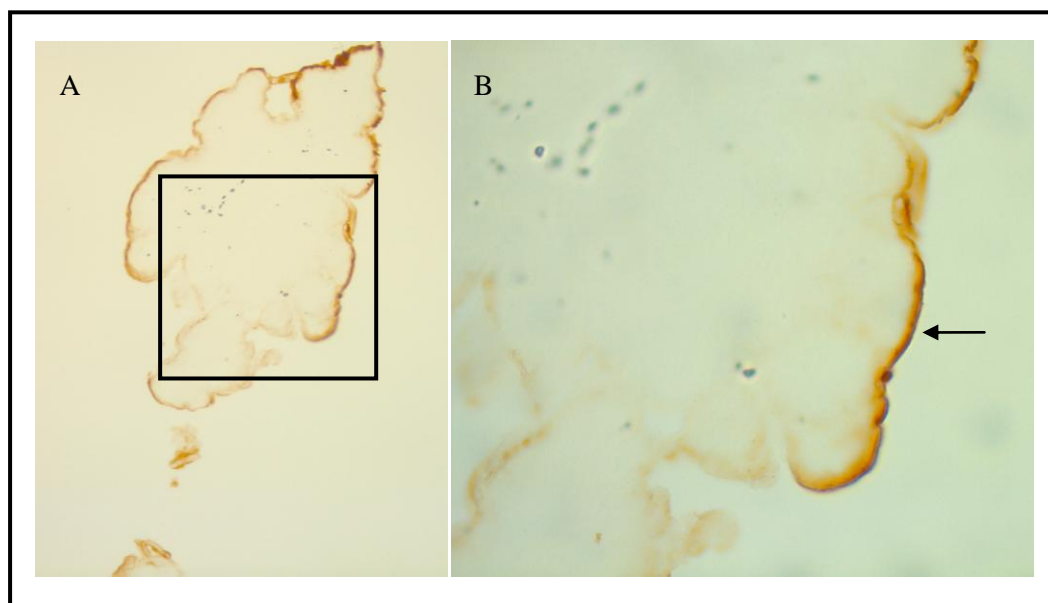


Figura III.16. Detecção da AgTGM98 por IHC utilizando a técnica de “whole mount” seguida de corte do intestino médio, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 48h; (A) corte 1 - observado com objectiva 40x; (B) corte 2 correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.

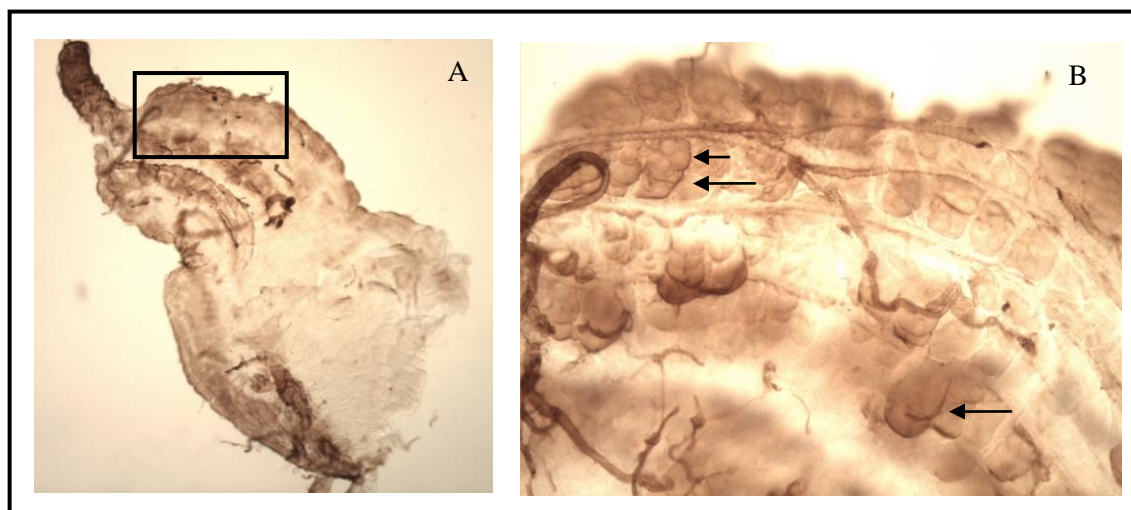


Figura III.17. Detecção da AgTGM98 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 18h; (A) observado com objectiva 10x; (B) correspondente do quadrado preto da imagem A (zona anterior do intestino médio) - observado com objectiva 40x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.

Resultados

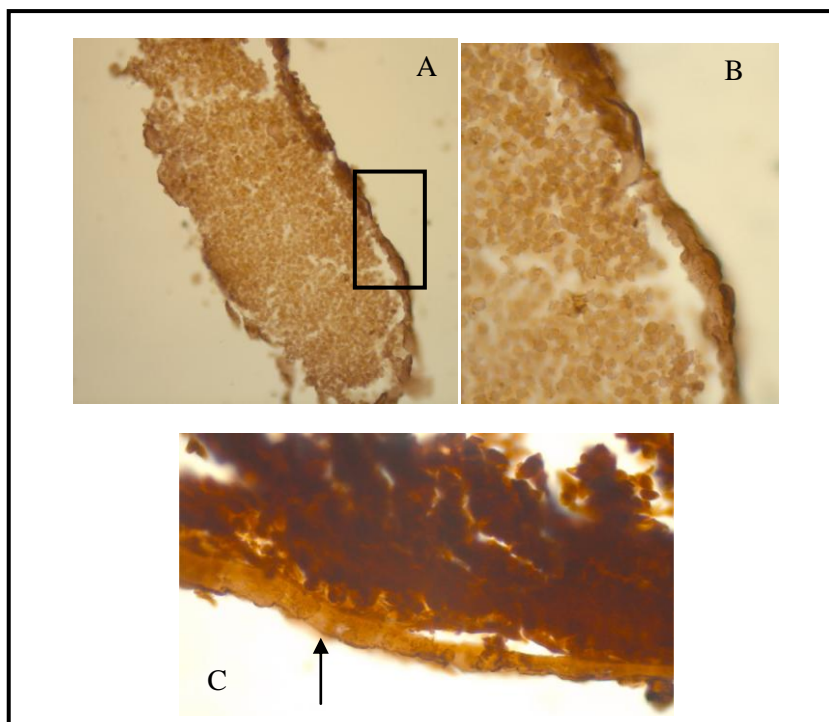


Figura III.18. Detecção da AgTGM98 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos alimentados com sangue parasitado com *P. berghei* (A) 24h pós-alimentação – observado com objectiva 40x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x; (C) Mosquitos alimentados com sangue não parasitado 18h após a refeição sanguínea - observado com objectiva 100x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.

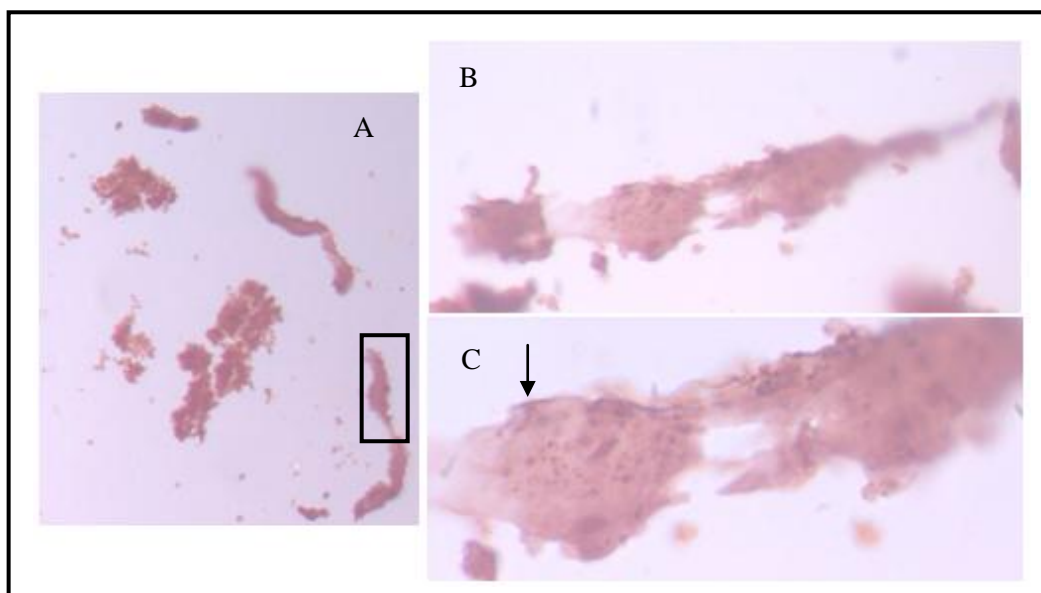


Figura III.19. Detecção da AgTGM98 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos alimentados com sangue parasitado com *P. berghei* 18h após alimentação (A) Observado com objectiva 10x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x; (C) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x. Setas pretas-

distribuição membranar da proteína.

É de salientar que na detecção da AgTGM98 (e, conforme se mostrará mais à frente da AgTGM100) os mosquitos alimentados com glucose, cujo objectivo, além de funcionarem como controlo à refeição sanguínea, era evidenciarem diferenças e/ou semelhanças na localização desta proteína ao nível do intestino médio. Dado o facto de os mosquitos utilizados neste ensaio controlo terem todos a mesma idade, foi possível estabelecer uma linha temporal paralela à inicialmente prevista (e relacionada com a data da refeição sanguínea) que permitiu estudar as TGM do mosquito à medida que os mosquitos foram envelhecendo e que revelou, de facto padrões de detecção diferentes nestas amostras.

III.10 - Localização da AgTGM100

A localização da proteína AgTGM100 foi realizada por IHC (II.2.19 e II.2.21) com os anticorpos produzidos apresentados no ponto II.2.8. As diluições utilizadas foram de 1:500 do anticorpo anti-AgTGM100 e 1:200 do anticorpo secundário anti-IgG de coelho conjugado com avidina-HRP.

Em corte histológico de um mosquito alimentado com sangue parasitado com *P. berghei* 18h após alimentação, observa-se maior intensidade de sinal no proventrículo e na parte mais anterior do intestino médio (figura III.20).

A localização da AgTGM100 foi confirmada quando se utilizou a técnica de “whole mount crushed” (figura III.21), a detecção efectuada mostra que, além da localização citoplasmática, existe um sinal mais forte na zona do proventrículo (figura III.21A e B) e um sinal de menor intensidade no resto do intestino médio (pormenor na figura III.21C). Em intestinos médios distintos, do mesmo ponto temporal (24h) de mosquitos alimentados com glucose (figuras III.22 e III.23), é possível observar o mesmo padrão, ou seja, localização citoplasmática da AgTGM100, no entanto, em contraste com a figura III.21, a distribuição do sinal encontra-se em todo o intestino médio e não apenas circunscrito à zona mais apical e proventrículo. Existe a confirmação da localização desta proteína ao longo do tempo (figura III.24). Comparando a localização da AgTGM98 e AgTGM100 (figuras III.17 e III.22) é possível observar que existem diferenças marcantes na forma onde se dá a detecção.

Resultados

A proteína AgTGM100 tem uma localização intracelular e uma distribuição presente apenas no proventrículo e zona mais apical do intestino médio durante uma fase da sua existência, sendo com o passar do tempo detectada em todo o intestino médio.

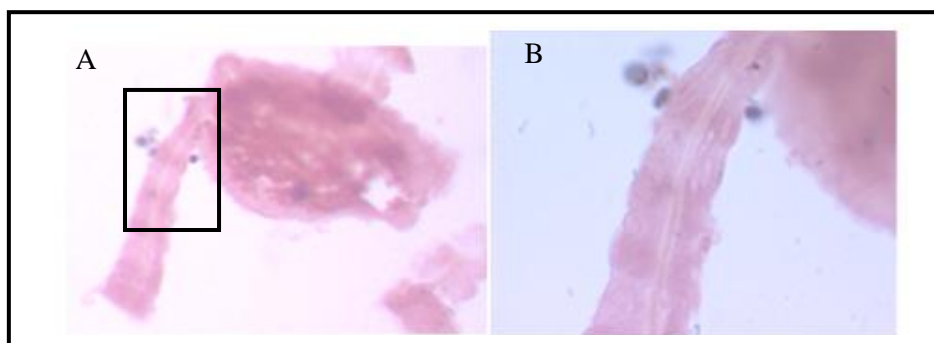


Figura III.20. Detecção da AgTGM100 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos alimentados com sangue parasitado com *P. berghei* 18h após alimentação (A) Observado com objectiva 20x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.

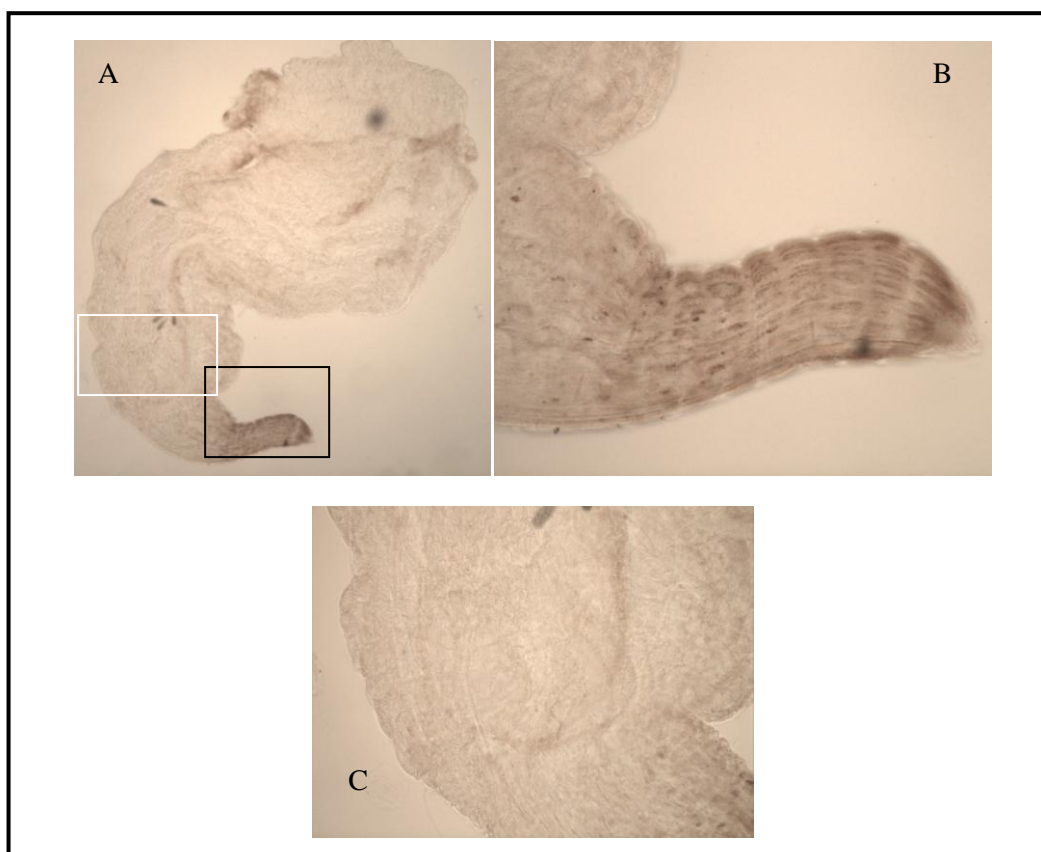


Figura III.21. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 18h; (A) observado com objectiva 10x; (B) correspondente do quadrado preto da observado com objectiva A

Resultados

(proventrículo) - observado com objectiva 40x. (C) Correspondente do quadrado preto da imagem A (zona anterior do intestino médio) - observado com objectiva 40x.

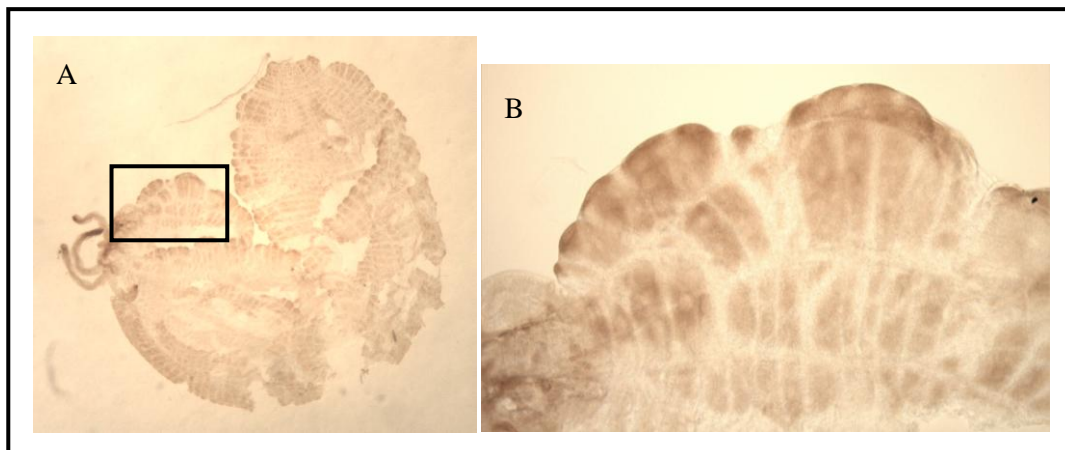


Figura III.22. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 24h; (A) observado com objectiva 5x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A (zona posterior do intestino médio) - observado com objectiva 40x.

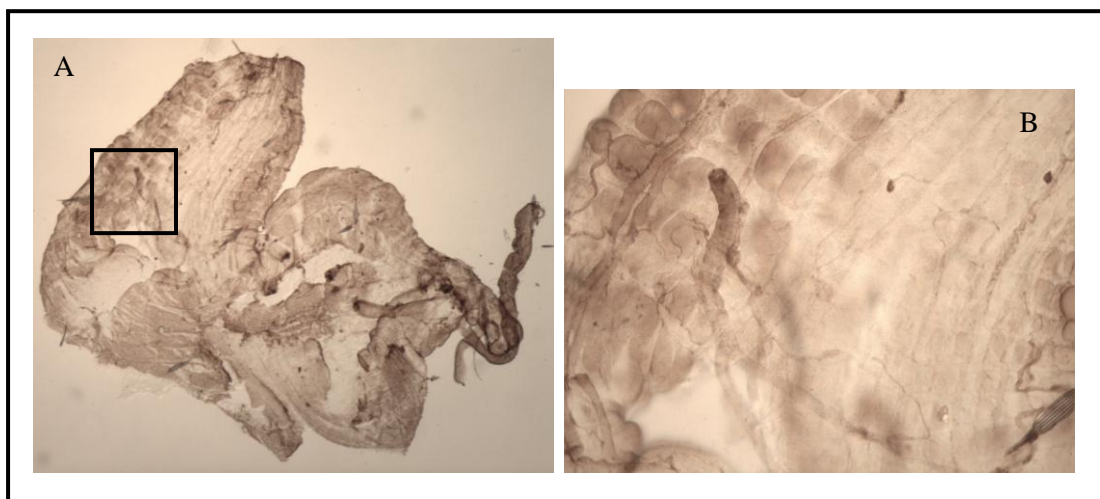


Figura III.23. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 24h; (A) observado com objectiva 5x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A (zona anterior do intestino médio) - observado com objectiva 40x.

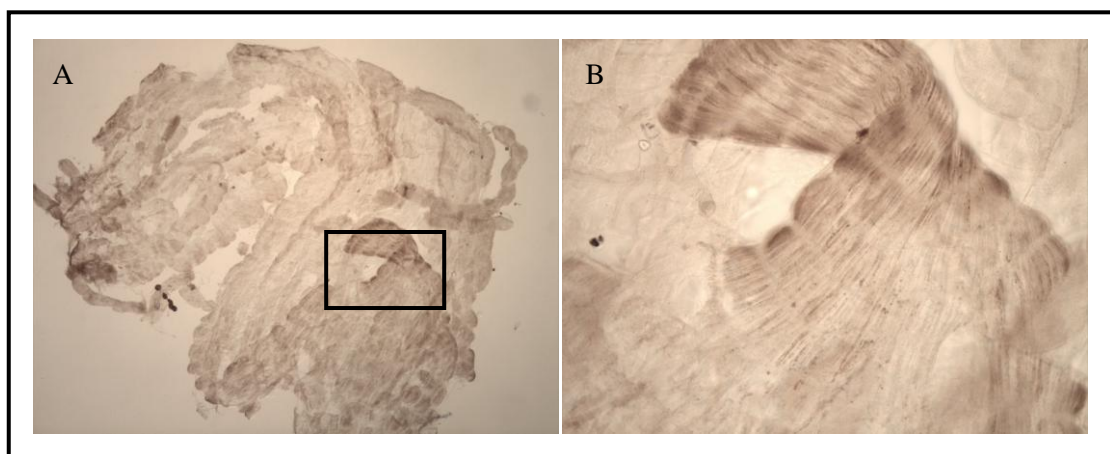


Figura III.24. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 48h; (A) observado com objectiva 10x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.

IV - Discussão e conclusões

Para que fosse possível caracterizar e estudar as TGMs de *A. gambiae* foi necessário expressar e purificar a proteína recombinante referente à AgTGM98, que permitisse produzir um anticorpo policlonal capaz de detectar esta proteína. Para a AgTGM100 todo este processo foi realizado por um fornecedor especializado (GL Biochem, Shanghai, China) tendo apenas sido utilizado neste trabalho, o anticorpo fornecido. Começou-se pela inserção da sequência alvo de AgTGM98-1 num vector bacteriano (pET-28a(+)), e posteriormente a transformação de *E. coli* BL21(DE3) PlysS com a construção produzida. A transformação das bactérias foi de grande sucesso e a quantidade de proteína recombinante produzida foi elevada (1,73 mg/ml). Para que a expressão fosse ótima, verificou-se que seria necessário recorrer-se à purificação da proteína 3h após indução e a uma temperatura de 28°C (figura III.3). Verificou-se também que a proteína se encontra tanto na fase solúvel como na fase insolúvel dos lisados bacterianos, no entanto apenas se purificou a proteína recombinante, AgTGM98-1 de 25,9 kDa, da fase solúvel (figura III.4). Estima-se que a proteína purificada apresente 25,9 kDa indicando que não houve degradação proteolítica específica do sistema de expressão (anexo 3).

Os anticorpos policlonais produzidos pelos murganhos imunizados contra a proteína recombinante purificada AgTGM98-1, foram obtidos com um título baixo, quando testado com o método ELISA, no entanto, outros métodos mostraram que os anticorpos produzidos apresentavam títulos superiores e que estes estavam aptos para ser utilizados em métodos como western blotting e IHC. Mais tarde foi possível, por western blotting, verificar que, embora os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante purificada a detectassem, eram visíveis mais do que uma banda (figura III.7), o que poderá estar relacionado com diferentes conformações da proteína recombinante presentes no extrato analisado. Verificou-se também, por IHC, que os anticorpos produzidos contra a proteína recombinante purificada eram específicos (figura III.20).

A atividade da TGM foi quantificada em mosquitos adultos *A. gambiae* e nos respectivos estados larvares e pupal. Apesar das diferenças encontradas não serem estatisticamente significativas (anexo 4), verifica-se que nos machos é superior sendo consistente com o trabalho de Rogers et al. (2009), no qual os autores demonstram que a atividade enzimática da TGM nos machos está associada às MAGs, sendo o gene

AGAP009099 o responsável por essa atividade. As fêmeas não apresentam estas glândulas e as larvas e pupas, à partida, não necessitam da função à qual a proteína codificada por este gene está associada, e poderá ser por esse motivo que se observa este padrão de atividade enzimática. A actividade enzimática ligeiramente superior nas larvas do estadio 1, quando comparada com outros estadios, pode ser explicada pelo facto de as primeiras fases de desenvolvimento se dar um aumento generalizado na actividade enzimática. Shibata et al. (2010), mediram a atividade enzimática da TGM em *Drosophila* sp, observaram um acentuado aumento no terceiro estadio larvar e nos adultos, mas *A. gambiae* tem três TGM e, portanto, não se espera que os perfis estadio-específicos de actividade correspondam ao apresentado por *Drosophila* sp. Existem também evidências de que a estrutura do coágulo em *Drosophila* sp difere do de *A. gambiae*, levando a diferentes metodologias no estudo de coagulação em mosquitos (Agianian et al., 2007), o que sugere a necessidade de um método diferente para avaliar a actividade da TGM de anofelíneos. Os valores obtidos neste ensaio são muito baixos quando comparados com os estudos feitos por outros autores (Rogers et al., 2009; Shibata et al., 2010), provavelmente pela falta de quantidade de proteína ou pela degradação desta durante os ensaios de atividade enzimática. No entanto, é de ressaltar que nenhum dos autores acima referidos utilizou o método descrito neste trabalho para a determinação da atividade enzimática.

Caracterizou-se o padrão de detecção da AgTGM98 e AgTGM100 de larvas L2, L4 e pupas. Em relação à AgTGM98 observa-se na figura III.9 duas bandas com pouca intensidade, com cerca de 80 – 100 kDa e uma banda com cerca de 40 – 50 kDa. No entanto, não se podem tirar conclusões da imagem apresentada, porque a figura têm um “background” acentuado e o método para a detecção desta proteína nestes estadios ainda necessita de ajustes, pois têm-se mostrado muito difícil atingir as concentrações proteicas adequadas a uma boa detecção. A perspectiva futura neste ponto é melhorar o método de extração proteica nas larvas e pupas, de forma a eliminar a degradação das amostras. O padrão de detecção de AgTGM100 mostra na figura III.13 uma banda com cerca de 90 – 100 kDa para larvas do estadio L4, no entanto o peso molecular esperado para a proteína AgTGM100 seria de 82,8 kDa. Foi descrito por Custódio et al. (em preparação), que não se dava amplificação do gene que codifica para a AgTGM100 em larvas, mas como se observa na figura III.13, foi detectado a sua presença em larvas do

estadio L4. Não obstante, os resultados apresentados na figura são passíveis de repetição, pois neste ensaio não foi realizado controlo.

Em fêmeas adultas é possível observar duas bandas, uma com peso esperado de 86,5 kDa, correspondente à AgTGM98 e uma dupla banda de peso molecular inferior, de aproximadamente 50 - 60 kDa (figura III.8). Observando o mapa do transcrito da AgTGM98 (figura IV.1) observam-se 4 exões, ou seja, provavelmente a dupla banda de peso molecular mais baixo se deva a splicing alternativo, resultando posteriormente numa proteína diferente da esperada. Tendo em conta estes resultados é necessária a identificação das proteínas correspondentes às bandas detectadas, o que está neste momento em curso, recorrendo a espectometria de massa na Universidade de Aveiro.



Figura IV.1. Sumário do transcrito de AGAP009098. Exões: 4, tamanho do transcrito: 2515 pb, tamanho após translação: 766 resíduos. Fonte: Vectorbase.

As 24h, D8 e D18 são pontos-chave, pois os zigotos formados no lúmen do intestino médio invadem e atravessam o epitélio aproximadamente 24h após a ingestão de sangue, após uma semana começa a maturação dos oocistos que libertam esporozoítos para o hemocélio do mosquito (D8), e cerca de 2 semanas (D18) após a infecção, estes invadem as glândulas salivares (Service, 1980; Baton & Ranford-Cartwright, 2005; Whitten et al., 2006; Yassine & Osta, 2009; CDC, 2012). Desta forma, foram analisadas por western blotting proteínas extraídas de mosquitos em todos estes pontos temporais, para caracterizar a presença das TGMs em intestino médio, corpo gordo e glândulas salivares.

Às 24h, para AgTGM98, observa-se na figura III.10 nos poços 2, 5 e 6, duas bandas, sendo que a banda superior apresenta 86,5 kDa, correspondente à AgTGM98, e a inferior cerca de 75 kDa, em corpo gordo e adultos, tanto em mosquitos alimentados com sangue infectado como nos alimentados com sangue não infectado e uma banda ténue de 86,5 kDa nos intestinos médios de ambas as alimentações, observa-se ainda, nos intestinos médios, bandas de alto peso molecular (superior a 250 kDa). A detecção

desta banda de alto peso molecular apenas se deu às 24h e em intestinos médios, não sendo consistente com o que se observa nos poços 3 e 6 da figura III.10, pois estes são resultado de extrações feitas a partir de mosquitos inteiros, por esse motivo seria de esperar que aqui também se visualizasse uma banda de alto peso molecular. Foi descrito por Yeh et al. (2006) que apesar de o peso molecular da TGM de *P. monodon* se apresentar com cerca de 170–180 kDa, o que se estimou por purificação e posterior análise por SDS-PAGE apresenta 85–90 kDa (peso molecular esperado), tanto em condições redutoras como não redutoras, sugerindo que esta proteína existe como homodímero não covalente, que é dissociado na presença de SDS durante a electroforese. No entanto, tendo a caracterização de AgTGM sido realizada através SDS-PAGE, não seria de esperar observar a detecção de uma proteína de tão alto peso molecular, mas sim de bandas com peso molecular esperado e/ou bandas de peso molecular inferior, como já foram descritas na figura III.9. Perante este resultado intrigante, será necessário uma identificação por espectrometria de massa das bandas detectadas, cujos resultados não estão ainda disponíveis. Não se pode tirar qualquer conclusão acerca das diferenças de intensidade das bandas entre grupos de mosquitos infectados com sangue infectado com *P. berghei* e mosquitos alimentados com sangue não infectado, pois não foi possível realizar o controlo nesta experiência.

Às 24h para AgTGM100 observa-se na figura III.14, uma banda com cerca de 37 kDa no corpo gordo, tanto em mosquitos alimentados com sangue infectado como nos alimentados com sangue não infectado e uma banda com cerca de 50 kDa no intestino médio também em ambas as alimentações. O peso molecular esperado para AgTGM100 é de 82,8 kDa, mostrando as detecções efectuadas por western blotting um padrão muito diferente do esperado. Este facto é muito interessante pois quando se compara a detecção em intestino médio e corpo gordo, observam-se bandas com pesos moleculares diferentes, o que nos leva a sugerir a existência de conformações distintas da mesma proteína, devido a splicing alternativo durante a transcrição, pois como se pode observar no mapa do transcrito da AgTGM100 (figura IV.2), o transcrito apresenta 5 exões, situação que poderá ser esclarecida após identificação das proteínas obtidas. Os resultados apresentados na figura III. 14 são também passíveis de repetição, pois nestes ensaios não foram realizados o controlo.

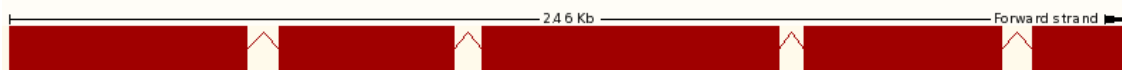


Figura IV.2. Sumário do transcrito de AGAP009100. Exões: 5, tamanho do transcrito: 2205 pb, tamanho após translação: 734 resíduos. Fonte: Vector base(2).

Os estudos de Wang et al. (2010), em *Drosophila* sp, e Liu et al. (2007), em *Fenneropenaeus chinensis*, mostraram que a TGM destes organismos tem um papel na imunidade e Silveira et al. (2012) associaram a AgTGM98 de *A. gambiae* à infecção por *Plasmodium*. Observando as figuras III.11 e III.12 é possível verificar uma diminuição da intensidade da banda correspondente à AgTGM98, comparando mosquitos não infectados com infetados, respectivamente. Este facto sugere alterações na expressão desta proteína face à invasão pelo parasita, o que pode significar o seu envolvimento directo na infeção. No entanto, serão necessários outro tipo de estudos que permitam confirmar esta hipótese.

A detecção por western blotting das TGMs de *A. gambiae* foi dificultada pelo processo de extracção e pelo facto do passo de stripping da membrana não permitir a remoção eficaz dos anticorpos previamente utilizados, impedindo desta forma a detecção da proteína controlo (figuras III.8, III.10, III.13). Nos casos em que se tentou detectar a actina em simultâneo com as duas TGMs em estudo, apenas foi conseguida a co- detecção para a AgTGM98.

Para se caracterizar a localização das AgTGM98 e AgTGM100 utilizou-se utilizou-se IHC. Numa primeira abordagem foi decidido a revelação cromogénica da ligação de anticorpo:antigénio, utilizando para o efeito o reagente DAB que confere uma coloração castanha à reacção, quando na presença de HRP (Sternberger, 1974). Na preparação do material foi necessário proceder a várias técnicas para se perceber qual seria o melhor método. Pelo que se observou, o melhor método experimentado até à data, será a detecção por técnica de “whole mount”, seguindo-se a montagem entre lâmina e lamela, no presente trabalho descrita e denominada por “crushed”, no entanto esta técnica não é perfeita para o efeito pretendido, pois como consequência do tipo de montagem verifica-se uma diminuição na capacidade de resolução das imagens, para melhorar este aspecto, poder-se-à abrir o intestino médio após a detecção por “whole

mount crushed”. Existiram bastantes condicionantes no corte dos intestinos médios inseridos em parafina, devido ao facto de ser um material de pequena dimensão e sem coloração (mosquitos alimentados com glucose) e por ser bastante frágil. Adicionalmente, verificou-se que a presença de sangue no interior do intestino médio trazia problemas tanto na obtenção de cortes do respectivo material biológico (exemplo figura III.16), como na interferência no sinal aquando da detecção, tanto na técnica de IHC seguida de corte, como na técnica de “whole mount”. O ideal para a melhoria da técnica seria a eliminação do sangue presente no interior do intestino médio antes da fixação do material que se irá ser submetido à técnica de IHC.

O que se pretendia, em termos de objectivo deste trabalho, seria caracterizar ambas as AgTGM noutros pontos temporais, além dos que se utilizou para a técnica de western blotting. Era pretendido analisar a localização destas proteínas às 18h, 24h, 48h, D8, D9, D10 e D14 de mosquitos com alimentação com sangue infectado com *P. berghei*, e dos respectivos controlos, mosquitos com alimentação com sangue não infectado e mosquitos com alimentação com glucose. Para isso seria necessário realizar cortes de mosquitos inteiros, pois não seria possível utilizar a técnica de “whole mount crushed” nos pontos temporais após D8, no entanto, verificou-se ser difícil realizar cortes de mosquitos inteiros devido ao seu revestimento de quitina, por esse motivo e acrescentando o já referido problema da interferência pela presença de sangue apenas se mostra o que já se desenvolveu até ao momento da apresentação deste trabalho. Como perspectiva futura neste ponto, será interessante tentar “suavizar” a quitina, para que seja possível efectuar cortes histológicos.

Para que se conseguisse realizar a detecção das TGM de *A. gambiae* estudadas neste trabalho, foi necessário fazer a validação da técnica com um anticorpo controlo, para isso utilizou-se um anticorpo contra a β -actina. O padrão de detecção desta proteína pode ser observado na figura III.13, obtida de intestino médio de mosquitos fêmea alimentados com glucose, é um padrão de localização intracelular. Foi ainda realizado um teste de especificidade do anticorpo anti-TGM98, onde se verificou que o anticorpo é específico para a proteína recombinante produzida (também visível pela especificidade do sinal detectada no tecido com o anticorpo sem pré-absorção).

Comparando a figura III.15 com a figura III.16, observam-se diferenças

marcantes na forma como se dá a detecção, apesar do método para a sua detecção ser o mesmo. A localização da proteína AgTGM98 na figura III.16 é notavelmente de uma proteína com um comportamento membranar para o lado basal do intestino médio, pois observa-se uma “linha” (castanha). Por oposição de técnica utilizada, apresenta-se a figura III.17 que foi obtida a partir da técnica de “whole mount crushed” de mosquitos alimentados com glucose, no entanto o padrão de detecção da proteína AgTGM98 é consistente com o observado na figura III.16, ou seja, observa-se um padrão que indica uma distribuição membranar (setas pretas) e a presença apenas na parte basal do epitélio. Pode-se ainda verificar nesta figura que a proteína AgTGM98 está presente em todo o intestino médio, mas observa-se um maior sinal no proventrículo, ainda assim não se pode tirar conclusões quanto à parte posterior do intestino médio porque, como se pode verificar, esta amostra apresenta-se rasgada. A figura III.18, é um exemplo de que existe claramente uma interferência devido à presença de sangue no intestino médio, (interferência na detecção do sinal e a fragmentação do corte do intestino médio). Ainda assim é possível verificar nesta imagem, obtida a partir do intestino médio de um mosquito alimentado com sangue parasitado por *P. berghei* 18h após a alimentação, o mesmo padrão de comportamento membranar no lado basal do intestino médio (seta preta da figura III.18). Um exemplar de corte de intestino médio com sangue parasitado por *P. berghei* 24h após a alimentação (pouca quantidade) observa-se na figura III.19 com o mesmo padrão visualizado nas outras imagens obtidas para AgTGM98, mas com um grânulos no interior além da distinta “linha” (setas pretas), o que indica uma localização membranar do lado basal do intestino médio e a sua possível aglomeração da proteína no interior das células epiteliais antes do seu transporte para a membrana.

Para comparação da proteína AgTGM98 apresentada na figura III. 19 apresenta-se a figura III.20 de AgTGM100, onde os intestinos médios são do mesmo ponto temporal e submetidos ao mesmo método de detecção. Verifica-se uma diferença marcante no padrão de detecção da AgTGM100 comparativamente à AgTGM98, pois na figura III.20 observa-se uma proteína com uma localização citoplasmática (tal como a β -actina) e verifica-se também que contrariamente ao observado para a AgTGM98, a distribuição da AgTGM100 se dá no proventrículo e na parte mais anterior do intestino médio. Na figura III.21 obtida a partir de um intestino médio do ponto temporal 18h, de

mosquitos alimentados com glucose, utilizando a técnica de “whole mount crushed”. O que se observa além da localização citoplasmática, é a presença de sinal mais forte na zona do proventrículo (figura III.21A e B) e um menor sinal no resto do intestino médio (pormenor na figura III.21C). As figuras III.22 e III.23 são dois intestinos médios distintos do mesmo ponto temporal (24h) de mosquitos alimentados com glucose, utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em ambas as figuras é possível observar o mesmo padrão, ou seja, localização citoplasmática da AgTGM100, no entanto, em contraste com as 18h após alimentação representadas na figura III.21, a distribuição do sinal encontra-se em todo o intestino médio e não apenas circunscrito à zona mais apical e proventrículo. É muito interessante constatar que, apesar de o intestino médio observado na figura III.24 ter sido submetido ao mesmo procedimento das figuras III.22 e III.23, mas provir um ponto temporal diferente (48h), o padrão de localização mantém-se igual ao visualizado às 24h (figuras III.22 e III.23), sendo desta forma possível afirmar que a AgTGM100 está presente apenas no proventrículo e zona mais apical do intestino médio durante uma fase da sua existência sendo depois produzida em todo o intestino médio.

Os diferentes padrões de localização da AgTGM98 e AgTGM100 evidenciam que estas proteínas poderão ter funções diferentes, deste modo pode-se afirmar que apesar do mosquito *A. gambiae* ter três TGM, ao contrário de outros artrópodes, estas podem não ter funções redundantes. No entanto, não é possível com os dados apresentados especificar uma função para cada uma destas proteínas.

Como conclusão, neste trabalho produziu-se e purificou-se uma proteína recombinante AgTGM98-1, que se utilizou para a produção de um anticorpo anti-AgTGM98. Realizaram-se western blots para a caracterização das TGMs de *A. gambiae*, que mostraram a possível existência de proteínas do tipo TGM obtidas a partir de splicing alternativo da sequência inicial. Mostrou-se uma possível participação da AgTGM98 na imunidade. Por fim, caracterizou-se a localização de AgTGM98 em intestinos médios, sendo esta uma localização membranar na parte basal do intestino médio e apresentando-se com uma distribuição ao longo deste. Contrariamente, a AgTGM100 tem uma localização intracelular e uma distribuição que está presente apenas no proventrículo e zona mais apical do intestino médio durante uma fase da sua existência, sendo com o passar do tempo detectada em toda a sua extensão.

V - Referências Bibliográficas

Referências Bibliográficas

- Agianian, B., Lesch, C., Loseva, O., Dushay, M. S., 2007. Preliminary characterization of hemolymph coagulation in *Anopheles gambiae* larvae. *Developmental and Comparative Immunology* 31:(9), 879–888.
- Barillas-Mury, C., 2007. CLIP proteases and *Plasmodium* melanization in *Anopheles gambiae*. *Trends in Parasitology* 23(7), 297-299.
- Baton, L. A., Ranford-Cartwright, L. C., 2005. Spreading the seeds of million murdering death: metamorphoses of malaria in the mosquito. *Trends in Parasitology* 21 (12), 573-580.
- Beckage N.E., 2008. *Insect Immunology*. 1ª edição. São Diego, Elsevier.
- Beninati, S. and Piacentini, M., 2004. The transglutaminase family: an overview: minireview article. *Amino Acids* 26, 367–372.
- Blandin, S., Levashina, E. A., 2004. Mosquito immune responses against malaria parasites. *Current Opinion in Immunology* 16, 16–20.
- CDC, 2012. Disponível em: <http://www.cdc.gov/MALARIA/>. [acedido em 16 Janeiro 2012].
- Cerenius, L., Kawabata, S., Lee B. L., Nonaka, M., Soderhall, K., 2010. Proteolytic cascades and their involvement in invertebrate immunity. *Trends in Biochemical Sciences* 35, 575–583.
- Chen, M., Hu, K., Huang, C., Song, Y., 2005. More than one type of transglutaminase in invertebrates? A second type of transglutaminase is involved in shrimp coagulation. *Developmental and Comparative Immunology* 29, 1003–1016.
- Cirimotich, C. M., Dong, Y., Garver, L. S., Sim, S., Dimopoulos, D., 2010. Mosquito immune defenses against *Plasmodium* infection. *Developmental and Comparative Immunology* 34, 387–395.
- Clarke, D., Mycek M., Neidle A., Waelsch H., 1957. The incorporation of amines into proteins. *Arch Biochem Biophys* 79, 338–354.
- Custódio, A., Pires, I., Borges, L., Palma, J., Pequito J., Silveira, H., em preparação. Characterization of *Anopheles gambiae* transglutaminases AgTG98 and AgTG100 upon infection by *Plasmodium berghei*.

Referências Bibliográficas

- Dushay, M. S., 2009. Insect hemolymph clotting. *Cellular Molecular Life Science* 66, 2643–2650.
- Fesus L., Piacentini M., 2002. Transglutaminase 2: an enigmatic enzyme with diverse functions. *Trends Biochem Sci* 27(10), 534–539.
- Folk , J. E., Cole, P. W., 1966, Mechanism of Action of Guinea Pig Liver Transglutaminase. *The Journal of Biological Chemistry* 241(23), 5518-5525.
- Greenwood, B. M., Fidock, D. A., Kyle, D. E., Kappe, S. H. I., Alonso, P. L., Collins, F. H., Duffy, P. E., 2008. Malaria: progress, perils, and prospects for eradication. *J. Clin. Invest.* 118, 1266–1276.
- Griffin, M., Casadio, R., Bergamini, C. M., 2002. Transglutaminases: nature's biological glues. *Biochem. J.* 368, 377-396.
- Iismaa, S. E., Mearns, B. M., Lorand, L., Graham, R. M., 2009. Transglutaminases and Disease: Lessons From Genetically Engineered Mouse Models and Inherited Disorders. *Physiol Rev* 89, 991–1023.
- Kiszewski A., Mellinger A., Spielman A., Malaney P., Sachs S. E., Sachs, 2004. A global index representing the stability of malaria transmission. *J. Am J Trop Med Hyg.* 70(5):486-98.
- Lehane M. J., 2005. *The Biology of Blood-Sucking in Insects.* 2ª edição. Cambridge: Cambridge University Press.
- Lindgren, M., Riazi, R., Lesch C., Wilhelmsson C., Theopold U., Dushay, M.S., 2008. Fondue and transglutaminase in the *Drosophila* larval clot. *Journal of Insect Physiology* 54, 586–592.
- Liu, Y., Li, F., Wang, B., Dong, B., Zhang, Q., Luan, W., Zhang, X., Xiang, J., 2007. A transglutaminase from Chinese shrimp (*Fenneropenaeus chinensis*), full-length cDNA cloning, tissue localization and expression profile after challenge. *Fish & Shellfish Immunology* 22, 576-588.
- Loof, T. G., Schmidt, O., Herwald H., Theopold U., 2011. Coagulation Systems of Invertebrates and Vertebrates and Their Roles in Innate Immunity: The Same Side of Two Coins? *Journal of Innate Immunology* 3, 34–40.
- Lorand, L., Graham R. M., 2003. Transglutaminases: Crosslinking enzymes with

Referências Bibliográficas

- pleiotropic functions. *Molecular Cell Biology* 4, 140-156.
- Marois, E., 2011. The multifaceted mosquito anti-*Plasmodium* response. *Current Opinion in Microbiology* 14, 429–435.
- Merckmillipore, 2012. Disponível em: http://www.merckmillipore.com/brazil/life-science-research/bl21de3plyss-competent-cells/EMD_BIO-69451-4/p_uuid [acedido em 14 Julho 2012].
- NCBI Taxonomy Browser, 2012. Disponível em: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/Taxonomy/Browser/wwwtax.cgi?mode=Root>. [acedido em 30 Janeiro 2012].
- Neill, U. S., 2011. From branch to bedside: Youyou Tu is awarded the 2011 Lasker~DeBakey Clinical Medical Research Award for discovering artemisinin as a treatment for malaria. *The Journal of Clinical Investigation* 121(10), 3768-3773.
- Pates, H. and Curtis, C., 2005. Mosquito behavior and vector control. *Annu. Rev. Entomol.*, 50, 53–70.
- Protein Blotting Guide - A Guide to Transfer and Detection. 3ª edição, Bio-Rad disponível em: http://www.bio-rad.com/LifeScience/pdf/Bulletin_2895.pdf.
- Sternberger, L.A., 1974. *Immunocytochemistry*. Prentice-Hall, Englewood Cliffs, NJ.
- Rao R. U., Chandrashekar R., Mehta K., 2005. Transglutaminases of lower organisms. *Prog Exp Tumor Res* 38, 209-22.
- Riehle, M., Guelbeogo, W., Gneme, A., Eiglmeier, K., Holm, I., Bischoff, E., Garnier, T., Snyder, G., Li, X., Markianos, K., Sagnon, N., Vernick, K., 2011. A Cryptic Subgroup of *Anopheles gambiae* Is Highly Susceptible to Human Malaria Parasites. *Science*, 331.
- Riehle, M.A., Srinivasan, P., Moreira, C. K., Jacobs-Lorena, M., 2003. Towards genetic manipulation of wild mosquito populations to combat malaria: advances and challenges. *The Journal of Experimental Biology* 206, 3809-3816.
- Rogers, D. W., Baldini, F., Battaglia, F., Panico, M., Dell, A., Morris, H. R., Catteruccia, F., 2009. Transglutaminase-Mediated Semen Coagulation Controls Sperm

Referências Bibliográficas

- Storage in the Malaria Mosquito. PLoS Biol 7(12).
- Service M. W., 1993. Community participation in vector-borne disease control. Ann Trop Med Parasitol. 87(3), 223-34.
- Service, M. W., 1980. A Guide to Medical Entomology. Macmillan International College Editions.
- Shibata, T., Ariki, S., Shinzawa, N., MiYaji, R., Suyama, H., Sako, M., Inomata, N., Koshiba, T., Kanuka, H., Kawabata, S., 2010. Protein crosslinking by transglutaminase controls cuticle morphogenesis in *Drosophila*. PlosOne 5(10).
- Silveira, H., Gabriel, A., Ramos, S., Palma, J., Felix, R., Custódio, A., Collins, L.V., 2012. CpG-containing oligodeoxynucleotides increases resistance of *Anopheles* mosquitoes to *Plasmodium* infection. Insect Biochemistry and Molecular Biology, 42(10), 758-65.
- Sugino, H., Terakawa, Y., Yamasaki, A., Nakamura, K., Higuchi, Y., Matsubara, J., Kuniyoshi, H., Ikegami, S., 2002. Molecular characterization of a novel nuclear transglutaminase that is expressed during starfish embryogenesis Eur. J. Biochem. 269, 1957-1967.
- The QIAexpressionist™ A handbook for high-level expression and purification of 6xHis-tagged proteins, 2003. 5ª edição. Disponível em: <http://www.qiagen.com/literature/default.aspx?Term=&Language=EN&LiteratureType=1&ProductCategory=339> [acedido em 14 Julho 2012].
- Thermo Scientific 2011 Pierce® BCA Protein Assay Kit. Disponível em: <http://www.piercenet.com/instructions/2161296.pdf> [acedido em 14 Julho 2012].
- Vectorbase(2), 2012. Disponível em: http://www.vectorbase.org/Anopheles_gambiae/Transcript/Summary?db=core;g=AGAP009100;r=3R:25597268-25599732;t=AGAP009100-RA [acedido em 6 Outubro 2012].
- Vectorbase, 2012. Disponível em: http://www.vectorbase.org/Anopheles_gambiae/Transcript/Summary?db=core;g=AGAP009098;r=3R:25583653-25586392;t=AGAP009098-RA. [acedido em 6 Outubro 2012].

Referências Bibliográficas

- Vlachou D., Schlegelmilch T., Christophides G. K., Kafatos F. C., 2005. Functional genomic analysis of midgut epithelial responses in *Anopheles* during *Plasmodium* invasion. *Curr Biol.* 15(13), 1185-95.
- Wang, S., Ghosh, A., Bongio, N., Stebbings, K., Lampe, D., Jacobs-Lorena, M., 2012. Fighting malaria with engineered symbiotic bacteria from vector mosquitoes Sibao, PNAS.
- Wang, Z., Wilhelmsson, C., Hyrsl, P., Loof, T. G., Dobes, P., Klupp, M., Loseva, O., Mörgelin, M., Ikle, J., Cripps, R. M., Herwald, H., Theopold, U., 2010. Pathogen Entrapment by Transglutaminase—A Conserved Early Innate Immune Mechanism. *PLoS Pathog* 6(2).
- Wenk, M. R. and Fernandis, A. Z., 2007. A manual for biochemistry protocols volume 3. Singapura: World Scientific Publishing Co. Pte. Ltd
- Whitten, M. M. A., Shiao, S. W., Levashina, E.A, 2006. Mosquito Midguts and malaria: cell biology, compartmentalization and immunology. *Parasite Immunology* 28, 121–130.
- WHO, 2011. World malaria report 2011. Disponível em: http://www.who.int/malaria/world_malaria_report_2011/en/index.html. [acedido em 16 Janeiro 2012].
- WHO, 2012. International Travel and Health book. Disponível em: <http://www.who.int/ith/en/>. [acedido em 16 Janeiro 2012].
- Yassine, H. and OstaM. A., 2010. *Anopheles gambiae* innate immunity. *Cellular Microbiology*, 12(1), 1–9.
- Yeh, M., Kao, L., Huang, C., Tsai, I., 2006. Biochemical characterization and cloning of transglutaminases responsible for hemolymph clotting in *Penaeus monodon* and *Marsupenaeus japonicas*. *Biochimica et Biophysica Acta* 1764, 1167–1178.

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

Figuras

- Figura I.1.** Mapa com a distribuição de malária no mundo e áreas em risco de transmissão. Adaptado de International Travel and Health book, WHO, 2012.....2
- Figura I.2.** Ciclo de vida de *Plasmodium* spp, em ambos os hospedeiros. Adaptado de Neill, 2011.....4
- Figura I.3.** Dinâmica do desenvolvimento do parasita da malária no mosquito. Adaptado de Baton & Ranford-Cartwright, 2005.....5
- Figura I.4.** Distribuição mundial de mosquitos do género *Anopheles*. Rectângulo azul indica a espécie *Anopheles gambiae*. Adaptado de Kiszewski et al., 2004.....6
- Figura I.5.** (1) Vista dorsal (a) e lateral (b) de um ovo de *Anopheles*; (2) Larva de *Anopheles* à superfície da água, respirando através dos espiráculos situados no 8º segmento; (3) Pupa de *Anopheles*. Adaptado de Service, 1980.....7
- Figura I.6.** (1) Posição de repouso de um anofelíneo. (2) Diagrama da cabeça de anofelíneos adultos, fêmea e macho, mostra diferenças nos palpos e nas antenas. Os palpos costumam estar próximos do probóscis, na imagem estão separados para propósito de visualização. Adaptado de Service, 1980.....8
- Figura I.7.** Representação esquemática das respostas imunológicas efectoras (a vermelho) de *A. gambiae* contra *Plasmodium* spp, compostos por barreiras físicas, respostas imunes locais e sistémicas. Setas pretas indicam os tecidos que produzem diferentes moléculas efectoras. Adaptado de Yassine & Osta, 2010.10
- Figura I.8** Vias de sinalização IMD e Toll, envolvidas na defesa contra *Plasmodium*. Adaptado de Cirimotich et al., 2010.....12
- Figura I.9.** Várias reacções pós-transcricionais catalisadas por TGM. Resíduo dador de lisina (elipse roxa), resíduo aceitador de glutamina (retângulo azul). Adaptado de Lorand & Graham, 2003.....17

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

Figura I.10. Estrutura terciária de TGM2 e domínios da proteína. (A) Conformação compacta, inativa de TGM2 (B) Conformação ativa de TGM2. Adaptado de Iismaa et al., 2009.....	19
Figura I.11. (1) Árvore filogenética construída usando sequências de aminoácidos de TGM que mostra a relação entre várias TGM de bactérias (Bac), fungos (Fun), protozoários (Pro), artrópodes (Arth), insectos (Ins), ascídia (Asc), helmintas (Wor), peixes (Fis) e mamíferos (TGM 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7 e Band 4.2). Fonte: Rao et al., 2005; (2) Árvore filogenética de alinhamento comparativo de TGMs de humanos (TG 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, Banda 4.2 e FXIIIa) e TGMs de invertebrados, outros mamíferos, protistas, helmintas e peixes. Adaptado de Lorand & Graham, 2003.....	20
Figura I.12. Mecanismo putativo de imobilização de microrganismos no coágulo pela atividade da TGM. Adaptado de Wang et al., 2010.....	24
Figura I.13. Análise filogenética de TGM de insectos. Fonte: Rogers et al., 2009.....	25
Figura II.1: Desenho experimental para a avaliação das condições ótimas para o crescimento das bactérias recombinantes.....	32
Figura II.2. Esquema ilustrativo do funcionamento dos métodos de (A) ELISA sandwich e (b) ELISA indirecto.....	34
Figura II.3. Substrato cromogénico para HRP utilizado neste método. Adaptado de Protein Blotting guide, bio-rad.....	40
Figura III.1. Ilustração de placas de meio LB sólido suplementadas com Kan inoculadas com bactérias transformantes com (A) plasmídeo pET-28 sem inserto (controlo positivo da transformação) e (B) plasmídeo pET-28 que contém a nossa sequência de interesse.....	43
Figura III.2. Confirmação da presença do fragmento de interesse, com 698 pb pertencente a parte do gene codificante para AgTGM98. (1) Marcador (Hyperladder II) (2) DNA plasmídico de <i>E. coli</i> BL21DE23 amplificado por PCR com os primers descritos na tabela II.1.....	44
Figura III.3. Géis SDS-PAGE com extratos de proteínas de <i>E. coli</i> BL21DE23 transformantes às 3 h, 5 h e ON de forma a determinar as condições ótimas para a produção da proteína recombinante, (A) 28°C; 1 - controlo 3h; 2 - induzido (I) 3h; 3 -	

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

não induzido (NI) 3h; 4 - controlo 5h; 5 - I 5h; 6 - NI 5h; 7 - controlo ON; 8 - I 5h; 9 - NI 5h; (B) 37°C; 10 - controlo 3h; 11 - I 3h; 12 - NI 3h; 13 - controlo 5h; 14 - I 5h; 15 - NI 5h; 16 - controlo ON; 17 - I 5h; 18 - NI 5h; retângulo branco - proteína recombinante com peso molecular esperado de 25.9 kDa.....	45
Figura III.4. Géis SDS-PAGE com extratos de proteínas de <i>E. coli</i> BL21DE23 transformantes às 3 horas, a 28°C, (A) extracto solúvel; 1 - NI; 2 - I; e (B) extracto insolúvel 3 - NI; 4 - I.....	45
Figura III.5. Gel SDS-PAGE com extratos de proteínas de todos os passos da purificação da proteína recombinante através de IMAC (“Immobilized metal ion affinity chromatography”) com Ni-NTA. (1) extrato bruto após lisado, (2) 1ª centrifugação, (3) 1ª lavagem, (4) 2ª lavagem e (5) eluído final. Proteína recombinante com peso molecular esperado de 25.9 kDa.....	46
Figura III.6. Padrão de detecção por western blotting da β -actina C4 (controlo) em extratos brutos de mosquito fêmea.....	48
Figura III.7. Western blot com um anticorpo anti-His-tag detectando o eluído final da proteína recombinante AgTGM98_1 (seta preta).....	48
Figura III.8. Padrão de detecção por western blot da AgTGM98 em extratos brutos de mosquito fêmea.....	49
Figura III.9. Detecção da AgTGM98 em larvas e pupas de <i>A. gambiae</i> por western blotting. 1- L2; 2- L4; 3 – pupas.....	50
Figura III.10. Detecção da AgTGM98 em mosquitos <i>A. gambiae</i> por western blotting. (A) 24h pós-alimentação com sangue não-infectado. 1- Intestino médio; 2 – Corpo gordo; 3 – Mosquito inteiro. (B) 24h pós-alimentação com sangue infectado com <i>P. berghei</i> . 4 – Intestino médio; 5 - Corpo gordo; 6 – Mosquito fêmea.....	50
Figura III.11. Detecção da AgTGM98 em mosquitos <i>A. gambiae</i> por western blotting. (A) D8 pós-alimentação com sangue não-infectado. 1 - Mosquito inteiro; 2 – Corpo gordo. (B) D8 pós- alimentação com sangue infectado com <i>P. berghei</i> . 1 – Mosquito inteiro; 2 – Corpo gordo; M – Marcador de massa molecular. β -actina – 43 kDa.....	51
Figura III.12. Detecção da AgTGM98 em mosquitos <i>A. gambiae</i> por western blotting ao dia 18 após a refeição de sangue. 1- Glândulas salivares de mosquitos alimentados com	

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

sangue não infectado; 2 – Glândulas salivares de mosquitos alimentados com sangue infectado <i>P. berghei</i> . Retângulos brancos indicam a β -actina. M – Marcador de massa molecular.....	51
Figura III.13 Detecção da AgTGM100 em larvas L4 de <i>A. gambiae</i> por western blotting.....	53
Figura III.14 Detecção da AgTGM100 em mosquitos <i>A. gambiae</i> por western blotting. (A) 24h pós-alimentação com sangue não-infectado com <i>P. berghei</i> . 1- Corpo gordo; 2- Intestino médio (B) 24h pós-alimentação com sangue infectado. 3 – Corpo gordo; 4 – Intestino médio.....	53
Figura III.15. Detecção da β -actina por IHC através de “whole mount” seguido de corte do intestino médio, de mosquitos alimentados com glucose, ponto temporal 18h; (A) corte 1 - observado com objectiva 40x; (B) corte 2 - observado com objectiva 40x; (C) corte 2 correspondente do quadrado preto da imagem B – observado com objectiva 100x.....	54
Figura III.16. Detecção da AgTGM98 por IHC utilizando a técnica de “whole mount” seguida de corte do intestino médio, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 48h; (A) corte 1 - observado com objectiva 40x; (B) corte 2 correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.....	56
Figura III.17. Detecção da AgTGM98 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 18h; (A) observado com objectiva 10x; (B) correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.....	56
Figura III.18. Detecção da AgTGM98 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos alimentados com sangue parasitado com <i>P. berghei</i> (A) 24h pós-alimentação – observado com objectiva 40x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x; (C) Mosquitos alimentados com sangue não parasitado 18h após a refeição sanguínea - observado com objectiva 100x. Setas pretas - distribuição membranar da proteína.....	57
Figura III.19. Detecção da AgTGM98 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos	

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

alimentados com sangue parasitado com *P. berghei* 18h após alimentação (A) Observado com objectiva 10x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x; (C) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 100x. Setas pretas- distribuição membranar da proteína.....57

Figura III.20. Detecção da AgTGM100 em cortes após a técnica de IHC de mosquitos alimentados com sangue parasitado com *P. berghei* 18h após alimentação (A) Observado com objectiva 20x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.....59

Figura III.21. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 18h; (A) observado com objectiva 10x; (B) correspondente do quadrado preto da observado com objectiva A - observado com objectiva 40x. (C) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.....59

Figura III.22. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 24h; (A) observado com objectiva 5x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.....60

Figura III.23. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 24h; (A) observado com objectiva 5x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.....60

Figura III.24. Detecção da AgTGM100 por IHC utilizando a técnica de “whole mount crushed”, em mosquitos alimentados com glucose, controlo ao ponto temporal 48h; (A) observado com objectiva 10x; (B) Correspondente do quadrado preto da imagem A - observado com objectiva 40x.....61

Figura IV.1. Sumário do transcrito de AGAP009098. Exões: 4, tamanho do transcrito: 2515 pb, tamanho após translação: 766 resíduos. Fonte: Vectorbase.....65

Figura IV.2. Sumário do transcrito de AGAP009100. Exões: 5, tamanho do transcrito: 2205 pb, tamanho após translação: 734 resíduos. Fonte: Vector base(2).....67

Figura A2.1. Vector de clonagem pET-28a(+)......86

Lista de Figuras, Tabelas e Ilustrações

Tabelas

Tabela I.1 – Caracterização das TGMs identificadas em eritrócitos de mamíferos. Adaptado de Griffin et al., 2002.....	22
Tabela I.2 – Caracterização de TGM identificadas em invertebrados. Adaptado de Sugino et al., 2002; Yeh et al., 2006; Liu et al., 2007; Rogers et al., 2009; Shibata et al., 2010; Wang et al., 2010.....	23
Tabela II.1. Sequências de primers delineados para amplificação do fragmento correspondente ao gene <i>AGAP009098</i> por PCR.....	31
Tabela A1.1. Reagentes (organizado por ordem alfabética de nome).....	83
Tabela A1.2. Kits.....	85
Tabela A1.3. Equipamentos.....	85
Tabela A1.4. Composição dos géis de acrilamida utilizados nas análises por SDS-PAGE.....	85
Tabela A4.1. Dados da quantificação dos ensaios enzimáticos em U/mg (unidades de atividade de TGM / mg de proteína).....	87
Tabela A4.2. ANOVA one-way de múltiplas comparações com correcção de Bonferroni, dos resultados da tabela A.4.1, realizado no programa GraphPad Prism 6.0.....	87

Ilustrações

Gráfico III.1. Atividade TGM em cada estadio de desenvolvimento de <i>A. gambiae</i> . Realizado pelo método colorimétrico por hidroxamato (Folk & Cole, 1966). P- pupa; F- fêmea, M- macho. Médias \pm d.p de três experiencias independentes.....	47
Gráfico A3.1. Mobilidade electroforética (cálculo referente à figura 3.4B).....	87

Anexos

Anexo 1 – Reagentes e equipamentos

Tabela A1.1. Reagentes (organizado por ordem alfabética de nome)

Abreviatura	Nome	Marca
DPX	1,3-Dietil-8-fenilxantina	Sigma-Aldrich
DAB	3,3'-diaminobenzidina	Sigma-Aldrich
BCIP	5-bromo-4-cloro-3-indolilfosfato	Sigma-Aldrich
*	Acetona	Merk
*	Ácido acético	Merk
*	Ácido bórico	Sigma-Aldrich
*	Ácido clorídrico	Sigma-Aldrich
EDTA	Ácido etilenodiamina tetra-acético	Sigma-Aldrich
TCA	Ácido tricloroacético	Fluka
*	Ácido-L-glutâmico- γ -monohidroxamato	Sigma-Aldrich
*	Acrilamida	Bio-Rad
*	Adjuvante completo de Freund	Sigma-Aldrich
*	Adjuvante incompleto de Freund	Sigma-Aldrich
*	Agarose	Lonza
*	Água oxigenada 9%	Maia Lab
BSA	Albumina de soro bovina	
*	Anti-IgG de murganho conjugado avidina-HRP	GE Healthcare
*	Anti-IgG coelho HRP-ECL Peroxidase	GE Healthcare
*	Anticorpo conjugado avidina-HRP	GE Healthcare
*	Anti-His-tag	Sigma-Aldrich
*	Anti-IgG coelho conjugado avidina-HRP	GE Healthcare
*	Anti-IgG de murganho conjugado com fosfatase alcalina	Sigma-Aldrich
*	Anti-IgG murganho HRP-ECL Peroxidase	GE Healthcare
*	Anti- β -actina (C4)	Santa Cruz Biotechnology
*	Azul de bomofenol	Fluka
Kan	Canamicina	Sigma-Aldrich
*	Carbonato de Sódio	Merk
*	CBZ - L -Glutaminilglicina	Sigma-Aldrich
*	Cloreto de cálcio	Sigma-Aldrich

Anexos

	*	Cloreto de Ferro (III)	Sigma-Aldrich
	*	Cloreto de potássio	Merk
	*	Cloreto de sódio	Merk
Inibidores de proteases		cOmplete, EDTA-free Protease Inhibitor Cocktail Tablets	Roche
	*	Coomassie Blue	Fluka
PVDF		Difluoreto de polivinilideno	Thermo Scientific
SDS		dodecil sulfato de sódio	Sigma-Aldrich
	*	Fosfato monopotássico	Merck
	*	Fosfato sódico dibásico	Merck
	*	Gelatina	Sigma-Aldrich
	*	Giemsa	Panreac
	*	Glicerol	Merk
	*	Glicina	Sigma-Aldrich
	*	Glutaciona	Sigma-Aldrich
	*	Hidrogenocarbonato de sódio	Merk
	*	Hidróxido de sódio	Merk
	*	Hidroxilamina	Sigma-Aldrich
	*	HyperLadder II	Bioline
	*	Imidazole	Sigma-Aldrich
		Isopropil- β -D-tiogalactopiranosídeo	Sigma-Aldrich
	*	Leite magro em pó	Nestlé
LB		Luria Bertani Broth	Fluka
LB agar		Luria Bertani Broth Agar	Merk
MeOH		Metanol	Merk
		N,N,N',N'-Tetrametiletilenodiamina	Sigma-Aldrich
TEMED			
Ni-NTA 50%		Níquel – ácido nitrilitriacético	Qiagen
	*	Parafina	Merk
PFA		Paraformaldeído	Sigma-Aldrich
PBS		PBS	Sigma-Aldrich
APS		Persulfato amónia	Sigma-Aldrich
	*	Precision Plus Protein Standard	Bio-Rad
		TGM de fígado de porco da guiné	Sigma-Aldrich
gpTG			
	*	Tris	Sigma-Aldrich
Tr		Triton X-100	Sigma-Aldrich
T		Tween-20	Sigma-Aldrich
	*	Xilol	Merk
	*	β -mercaptoetanol	Merk

*Não aplicável

Tabela A1.2. Kits

Kit	Marca
Amersham™ ECL™ Prime	GE Healthcare
Deoxynucleotide Triphosphates (dNTPs)	Promega
GenElute™ Plasmid Miniprep Kit	Sigma-Aldrich
GoTaq® Flexi DNA Polymerase	Promega
Pierce BCA Protein Assay	Thermo

Tabela A1.3. Equipamentos

Equipamento	Marca
Centrifuga 5810R	Eppendorf
Espectrofotômetro UV300	Unicam
Estufa 37°C	
Fluorímetro	Triad
Incubadora 37°C de agitação	Ivymen
Máquina fotográfica	Leica DFC480
Microscópio	Leica DM2000
Microtomo	Leica
Mini Trans-Blot® Electrophoretic Transfer Cell	Bio-Rad
Mini-PROTEAN® II Electrophoresis Cell	Bio-Rad
NanoDrop™ 1000	Thermo
Power Pac 300	Bio-Rad
Sonicador - Ultrasonic Homogenizer	Cole Parmer
T1 Thermal Cycler	Biometra
Termobloco BBD	Grant Instruments
UVIDOC	UVItec

Tabela A1.4. Composição dos géis de acrilamida utilizados nas análises por SDS-PAGE.

Nome	Composição	Quantidades
Gel de resolução (12,5% acrilamida)		
Água MilliQ®	H ₂ O	4270 µl
Tampão resolvente (4x)	1,5M Tris, SDS 10% e água MilliQ®, pH 8,8	2500 µl
Acrilamida	Acrilamida / Bisacrilamida (37:1) 40%	3125 µl
APS	Persulfato amônia 15% (p/v)	100 µl
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina	5 µl
Gel de concentração (4% acrilamida)		
Água MilliQ®	H ₂ O	5140 µl
Tampão de concentração (4x)	0,5M Tris, SDS 10% e água MilliQ®, pH 6,8	2000 µl
Acrilamida	Acrilamida / Bisacrilamida (37:1) 40%	800 µl
APS	Persulfato amônia 15% (p/v)	50 µl
TEMED	N,N,N',N'- Tetrametiletilenodiamina	10 µl

Anexo 2 - vector pET-28a(+)

O vector pET-28a(+) apresenta uma configuração His+Tag® N-terminal/trombina/T7+Tag® com uma sequencia opcional C-terminal His+Tag®. A região de clonagem/expressão da cadeia codificante transcrita pela polimerase de RNA T7 (<http://www.staff.ncl.ac.uk/p.dean/pET.pdf>).

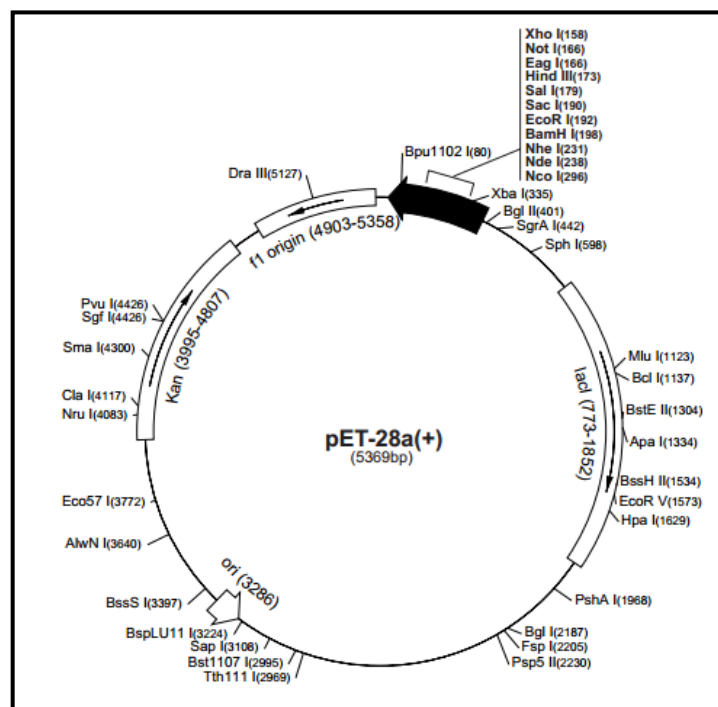
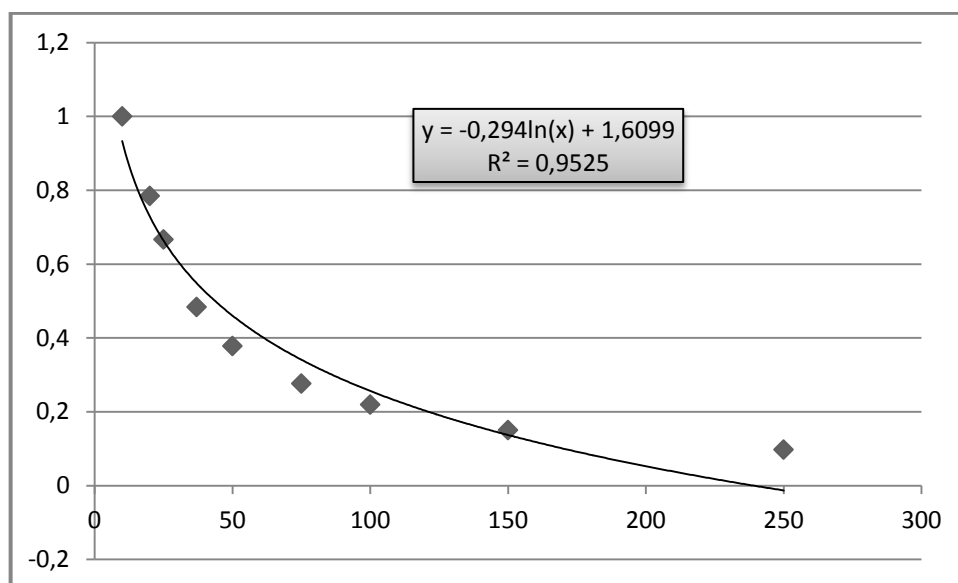


Figura A2.1. Vector de clonagem pET-28a(+).

Anexo 3 – Cálculo da mobilidade electroforética**Gráfico A3.1.** Mobilidade electroforética (cálculo referente à figura 3.4B)**Anexo 4** – Cálculos do ensaio enzimático**Tabela A4.1.** Dados da quantificação dos ensaios enzimáticos em U/mg (unidades de atividade de TGM / mg de proteína).

	1º ensaio	2º ensaio	3º ensaio	Média	Desvio padrão
L1	0,0289	0,0521	0,0100	0,0303	0,0211
L2	0,0193	0,0025	0,0010	0,0076	0,0102
L3	0,0101	0,0023	0,0030	0,0051	0,0043
L4	0,0217	0,0021	0,0030	0,0089	0,0111
Pupas	0,0175	0,0024	0,0020	0,0073	0,0088
Fêmeas	0,0143	0,0029	0,0010	0,0061	0,0072
Machos	-0,0005	0,1498	0,0030	0,0508	0,0858

Tabela A4.2. ANOVA one-way de múltiplas comparações com correcção de Bonferroni, dos resultados da tabela A.4.1, realizado no programa GraphPad Prism 6.0.

Number of families	1
Number of comparisons per family	21
Alpha	0,05

Bonferroni's multiple comparisons test	Mean Diff,	95% CI of diff,	Significant?	Summary
L1 vs. L2	0,02273	-0,08050 to 0,1260	No	ns
L1 vs. L3	0,0252	-0,07804 to 0,1284	No	ns
L1 vs. L4	0,0214	-0,08184 to 0,1246	No	ns
L1 vs. P	0,02303	-0,08020 to 0,1263	No	ns
L1 vs. F	0,02427	-0,07897 to 0,1275	No	ns
L1 vs. M	-0,02043	-0,1237 to 0,08280	No	ns
L2 vs. L3	0,002467	-0,1008 to 0,1057	No	ns
L2 vs. L4	-0,001333	-0,1046 to 0,1019	No	ns
L2 vs. P	0,0003000	-0,1029 to 0,1035	No	ns
L2 vs. F	0,001533	-0,1017 to 0,1048	No	ns
L2 vs. M	-0,04317	-0,1464 to 0,06007	No	ns
L3 vs. L4	-0,0038	-0,1070 to 0,09944	No	ns
L3 vs. P	-0,002167	-0,1054 to 0,1011	No	ns
L3 vs. F	-0,0009333	-0,1042 to 0,1023	No	ns
L3 vs. M	-0,04563	-0,1489 to 0,05760	No	ns
L4 vs. P	0,001633	-0,1016 to 0,1049	No	ns
L4 vs. F	0,002867	-0,1004 to 0,1061	No	ns
L4 vs. M	-0,04183	-0,1451 to 0,06140	No	ns
P vs. F	0,001233	-0,1020 to 0,1045	No	ns
P vs. M	-0,04347	-0,1467 to 0,05977	No	ns
F vs. M	-0,0447	-0,1479 to 0,05854	No	ns

Test details	Mean 1	Mean 2	Mean Diff,	SE of diff,	n1	n2	t	DF
L1 vs. L2	0,03033	0,0076	0,02273	0,02791	3	3	0,8146	14
L1 vs. L3	0,03033	0,005133	0,0252	0,02791	3	3	0,9030	14
L1 vs. L4	0,03033	0,008933	0,0214	0,02791	3	3	0,7668	14
L1 vs. P	0,03033	0,0073	0,02303	0,02791	3	3	0,8254	14
L1 vs. F	0,03033	0,006067	0,02427	0,02791	3	3	0,8695	14
L1 vs. M	0,03033	0,05077	-0,02043	0,02791	3	3	0,7322	14
L2 vs. L3	0,0076	0,005133	0,002467	0,02791	3	3	0,08839	14
L2 vs. L4	0,0076	0,008933	-0,001333	0,02791	3	3	0,04778	14
L2 vs. P	0,0076	0,0073	0,0003000	0,02791	3	3	0,01075	14
L2 vs. F	0,0076	0,006067	0,001533	0,02791	3	3	0,05494	14
L2 vs. M	0,0076	0,05077	-0,04317	0,02791	3	3	1,547	14
L3 vs. L4	0,005133	0,008933	-0,0038	0,02791	3	3	0,1362	14
L3 vs. P	0,005133	0,0073	-0,002167	0,02791	3	3	0,07764	14
L3 vs. F	0,005133	0,006067	-0,0009333	0,02791	3	3	0,03344	14
L3 vs. M	0,005133	0,05077	-0,04563	0,02791	3	3	1,635	14
L4 vs. P	0,008933	0,0073	0,001633	0,02791	3	3	0,05853	14
L4 vs. F	0,008933	0,006067	0,002867	0,02791	3	3	0,1027	14
L4 vs. M	0,008933	0,05077	-0,04183	0,02791	3	3	1,499	14
P vs. F	0,0073	0,006067	0,001233	0,02791	3	3	0,04419	14
P vs. M	0,0073	0,05077	-0,04347	0,02791	3	3	1,558	14
F vs. M	0,006067	0,05077	-0,0447	0,02791	3	3	1,602	14